

Knochenmorphogenesefaktor 7 (BMP-7) in Platten-
epithelkarzinomen der Lunge

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Niels Menck
geboren am 30.11.1974 in Freiburg im Breisgau.

Gutachter

1. Prof. Dr. Höffken
2. PD Dr. Wölfl
3. Prof. Dr. Sebald, Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. April 2003

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	4
1.1	Knochenmorphogenesefaktoren	4
1.2	Plattenepithelkarzinome der Lunge	9
1.3	Zielsetzungen	14
II.	Material und Methoden	15
2.1	Untersuchungsmaterial	15
2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	16
2.3	Immunhistologie	22
2.4	Statistik	24
III.	Ergebnisse	25
3.1	Untersuchungen auf mRNA-Ebene	25
3.2	Untersuchungen auf Proteinebene	37
3.3	Statistische Auswertung	42
IV.	Diskussion	48
V.	Zusammenfassung	59
	Anhang	60
	Literaturverzeichnis	65
	Veröffentlichungen	78
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	
	Lebenslauf	

I. Einleitung

1.1 Knochenmorphogenesefaktoren

Knochenmorphogenesefaktoren (Bone morphogenetic proteins (BMPs)) wurden zuerst als Faktoren beschrieben, die nach ektopischer Implantation in Ratten die Knochen- und Knorpelbildung induzierten (Urist 1965, Wozney et al. 1988, Celeste et al. 1990, Reddi 1997).

Es zeigte sich aber, daß BMPs für vielfältige biologische Aktivitäten in verschiedensten Zellen, darunter Monozyten, Epithelzellen, mesenchymalen und neuronalen Zellen, verantwortlich sind (Hogan 1996). Sie regulieren Wachstum, Differenzierung, Chemotaxis, Apoptose und spielen so eine wichtige Rolle in der Morphogenese fast aller Organe und Gewebe (Hogan 1996).

BMPs gehören mit Ausnahme von BMP-1 zur TGF- β (transforming growth factor) Superfamilie, die weiterhin die TGF- β s, die Aktivine und Inhibine und MIS (Müllerian inhibiting substance) umfaßt (Kingsley 1994). BMP-1 ist eine Cysteinproteinase, welche an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist und eine wichtige Rolle in der Organmorphogenese und Wundheilung spielt (Kessler et al., 1996).

Auch in vielen anderen Tierarten konnten BMPs identifiziert werden, so z.B. in der Fliege *Drosophila melanogaster*, dessen BMP-Homologe (dpp, 60A, Screw) denen der Säugetiere funktionell gleich sind (Sampath et al. 1993, Padgett et al. 1993).

Die Knochenmorphogenesefaktoren, von denen man inzwischen über 30 verschiedene kennt, werden als etwa 400 Aminosäuren lange Vorläufermoleküle („immature BMPs“) synthetisiert. Diese unterliegen vielfältigen posttranslationalen Veränderungen (z.B. Glykosylierungen). Das reife Protein mit seinen 7 hochkonservierten Cysteinresten entsteht durch Proteolyse an einer dibasischen Schnittstelle aus dem C-terminalen Anteil (ca. 110 Aminosäuren). Funktionelle BMPs finden sich immer als Dimere, wobei Heterodimere (z.B. zwischen BMP-2 und BMP-7) sehr viel potenter sind als Homodimere (Aono et al. 1995, Israel et al. 1999).

Extrazellulär wird die Funktion der BMPs durch Proteine reguliert, die zur Bildung inaktiver Komplexe führen: *noggin* (Zimmermann et al. 1996), *chordin* (Piccolo et al. 1996), *folliculin* (Yamashita et al. 1995, Fainsod et al. 1997), *gremlin* (Ski et al. 2001) und *dan* (Stanley et al. 1998).

Die BMP-Wirkungsentfaltung geschieht über die Bindung an spezifische membranständige Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren (ten Dijke et al. 1996). Diese besitzen jeweils eine extrazelläre Domäne mit Cystein-Anteilen, eine Transmembrandomäne, sowie die intrazelluläre Domäne mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität. Funktionelle BMP-Rezeptoren sind Heterotetramere, die aus jeweils 2 Typ I- und Typ II-Rezeptoruntereinheiten aufgebaut sind. Der Typ-II-Rezeptor kann dabei BMPs direkt binden, während für eine Interaktion mit dem Typ-I-Rezeptor eine vorherige Aktivierung des Typ II - Rezeptors Voraussetzung ist (Kawabata et al. 1995). Nach entsprechender Ligandenbindung formen die Rezeptoren einen hetero-oligomeren Komplex und aktivieren intrazellulär über die Serin-Threonin-Kinase SMAD-Proteine (SMAD 1, SMAD 5, SMAD 8) durch Phosphorylierung (Kretzschmar et al. 1997, Wilson et al. 1997), die daraufhin untereinander und dann mit SMAD 4 wiederum Oligomere bilden (Shi et al. 1997, Hata et al. 1997, Nakao et al. 1997).

Diese werden von inhibitorischen SMAD-Proteinen (SMAD 6, SMAD 7) reguliert, die entweder die Phosphorylierung oder die Komplexbildung anderer SMADs verhindern (Imamura et al. 1997, Hayashi et al. 1997, Nakao et al. 1997).

Die SMAD-Komplexe gelangen in den Zellkern. Dort steuern sie die Transkription entweder durch direkte Bindung oder mittels DNA-bindender Proteine, welche mit den SMAD-Komplexen interagieren (Keeton et al. 1991, Harada et al. 1997). Diese Vorgänge soll die nachfolgende Abbildung (Abbildung 1.1) verdeutlichen.

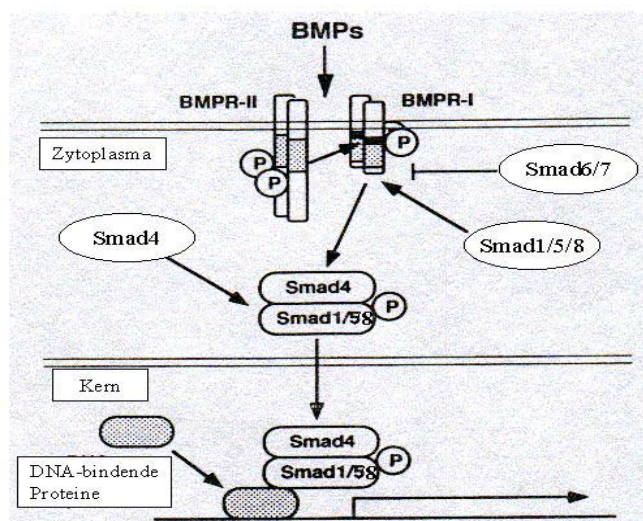


Abbildung 1.1: BMP-Signalkaskade

Knochenmorphogenesefaktoren in der embryonalen Entwicklung

BMPs spielen in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle (Hogan 1996). Sie kontrollieren induktive Interaktionen zwischen meso- und ektodermalen Zellen, regulieren die Zellproliferation und Apoptose. In manchen Organen werden BMPs im besonderen von kleinen Zellgruppen exprimiert, die als organisatorische Zentren für die Organbildung fungieren.

BMPs beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Signalen, die in der frühen Mesoderm- und Gewebebildung darüber entscheiden, ob es an einer gewissen Stelle des Embryos zu einer ventralen oder dorsalen Gewebsausrichtung kommt. Besonders BMP-4 gehört zu den potentesten Faktoren, die eine ventrale Entwicklung induzieren (Fainsod et al. 1997, Schmidt et al. 1995). In der frühen Gastrulation reguliert es dabei entgegengesetzt wirkende Gene wie *gooseoid*, *noggin* und *Xnot* herunter (Jones et al. 1996). Damit ist es wichtig für die Ausbildung sowohl des Ekto- als auch des Entoderms während dieser Entwicklungsperiode (Winnier et al. 1995, Mishina et al. 1995).

BMPs sind in vielen Organen und Geweben exprimiert. Unter anderem in der Haut, den Haaren, den Testes und Ovarien. So führt z.B. eine Überexpression von BMP-4 in Haarbälgen zu einer Inhibition der Proliferation und zum Haarausfall (Blessing et al. 1993) und BMP-6 ist an der Differenzierung von Keratinozyten maßgeblich beteiligt (Drozdoff et al. 1994).

BMPs steuern die Zell-Zell-Interaktionen während der frühen Zahnentwicklung. BMP-2/4/7 wurden in einer zentralen Epithel-Region lokalisiert, die ein Steuerzentrum für die Zahnknospenentwicklung darstellt (Vaahtokari et al. 1996a). BMPs induzieren dabei vor allem die epitheliale Differenzierung zu Ameloblasten und die mesenchymale zu Odontoblasten (Thesleff et al. 1995).

Während der Organogenese des Darmes wurden hohe Expressionslevel von BMP-4 einerseits im das Endoderm umgebenden Mesoderm gefunden (Jones et al 1991; Roberts et al. 1995; Winnier et al. 1995), andererseits in der späteren Entwicklung in bestimmten Regionen des Verdauungstraktes wie dem Magen (Bitgood und McMahon 1995).

BMPs (besonders BMP-4 und 7) sind in die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems involviert. Dabei führen sie zu einer epithelialen Differenzierung des Ektoderms zu Ungunsten der neuronalen Differenzierung (Wilson, Hemmati-Brivanlou 1995). Faktoren, die die Wirkung von BMP-Proteinen abschwächen, führen zu einer neuronalen Differenzierung (Lamb et al. 1993, Hemmati-Brivanlou et al. 1994, Sasai et al. 1994, 1995).

BMPs lenken multipotente Stammzellen in eine chondro- oder osteogenetische Differenzierung (Yamaguchi et al. 1991, Gimble et al. 1995). In Chondro- oder Osteoblasten bewirken sie eine Stimulation der Expression von Differenzierungsmarkern (alkalische Phosphatase, Osteokalzin-/Kollagen-Synthese, Bildung von Knorpel-Knötchen), haben aber nur geringe Auswirkung auf die Zellproliferation (Davidson 1995, Vukicevic et al. 1989, Sampath et al. 1992, Thies et al. 1992, Asahina et al. 1993, Harris et al. 1995). Gentechnisch hergestelltes BMP-7 wird bereits als Therapeutikum zur Verbesserung der Frakturheilung eingesetzt (Küsswetter und Technert 1999).

Viele BMPs (Bmp-3/4/5/6/7) werden vom embryonalen Nieren- und Harnwegsgewebe exprimiert (King et al. 1994, Bitgood und McMahon 1995, Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995). Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen BMP-5 und der Ureterentwicklung (King et al. 1994) sowie zwischen BMP-7 und der Nephrogenese (Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995). BMP-7 spielt einerseits eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen den metanephritischen Knospen und dem Mesenchym (Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben) andererseits reguliert es auch die Ausbildung der epithelialen Tubuli und Glomeruli (v.a. in Podozyten exprimiert). Homozygote BMP-7-Null-Mutanten-Mäuse sterben bald nach der Geburt an Nierenversagen, wobei es zu einer massiven Apoptose von desorganisiertem, uninduziertem Mesenchym kommt (Luo et al. 1995).

In der Lungenentwicklung kommt es zu vielfältigen Interaktionen zwischen der ventralen epithelialen Endodermknospe und dem umgebenden Splanchnicusmesoderm. Transkripte von BMP-4, BMP-5, BMP-7 wurden in embryonalen Lungen nachgewiesen (King et al. 1994, Bitgood und McMahon 1995, Bellusci et al. 1996). Besonders BMP-4 kommt eine wichtige Rolle in der Ausdifferenzierung des Bronchialbaumes zu: es vermindert die Endodermproliferation zugunsten der Ausbildung lateraler Bronchialäste und zugunsten der Mesenchymdifferenzierung. Kommt es in transgenen Embryos zu einer ektopen epithelialen BMP-4-Produktion der distalen Lungenknospen, bilden sich anstatt des Bronchialsystemes große ektatische Säcke (Bellusci et al. 1996).

Knochenmorphogenesefaktoren nach der Embryonalperiode

Auch nach der Embryogenese ist eine einwandfreie Funktion der BMPs unerlässlich. BMP-7 ist in der Niere für die Stimulierung und die Aufrechterhaltung der differenzierten epithelialen Zellen zuständig (Simon et al. 1999). BMP-4 ist an der Chemotaxis humaner Monozyten beteiligt (Cunningham et al., 1992). BMP-4 und BMP-7 verstärken die FSH-abhängige

Expression von Östrogen in den Granulosazellen des Rattenovars, während ein gegenläufiger Effekt bei Progesteron festzustellen ist (Shimasaki et al., 1999). Beide Effekte sind streng dosis- und zeitabhängig. BMP-2 scheint in glatten Muskelzellen der Gefäßwände eine Rolle bei der Antwort auf Gefäßwandverletzungen zu spielen (Willette et al., 1999).

Knochenmorphogenesefaktoren in Tumoren

Während der Tumorentstehung sowie Progression kommt es zu einer Dedifferenzierung, das heißt zu einem Rückfall der Zellen in Stadien der früheren Zellentwicklung (De Vita et al. 1993). Aus diesem Grund können BMPs auch in der Tumorgenese eine Rolle spielen. Bisher wurden BMPs in Tumoren der Prostata (Bentley et al. 1992), des Magens (Katho und Terada 1996), der Lunge (Tada et al. 1998), des Pankreas (Kleeff et al. 1999), des Ösophagus (Raida et al. 1999), der Mamma (Clement et al. 1999, Arnold et al. 1999, Clement et al. 2000), der Speicheldrüse (Zhao et al. 1998) und in Gliomen (Yamada et al. 1996) nachgewiesen.

In Karzinomen der Mamma, des Ovars, der Prostata und des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms besitzt BMP-2 einen antiproliferativen Effekt; außerdem reguliert es die Proliferation von Pankreas- und Prostatatumoren (Ide et al. 1997 und Kleeff et al. 1999). BMP-2, BMP-4 und BMP-7 führen zu einer Induktion und Hemmung der Apoptose in embryonalen Karzinomzellen (Glozak et al. 1996, 1998). Die Expression von BMP-6 in malignen Prostatatumoren ist eng mit dem Auftreten von Knochenmetastasen verknüpft (Hamdy et al. 1997). BMP-6 ist ebenfalls in Karzinomgeweben und Karzinomzelllinien der Mamma exprimiert, wobei die mRNA-Expression mit dem EGFR-Rezeptor-Signalweg in regulatorischer Verbindung steht (Clement et al. 1999).

Darüber hinaus wurde die Expression von BMP-7 in Mammakarzinomen (Schwalbe et al. 2000), Chondro-, Osteosarkomen und Prostatakarzinomen nachgewiesen (Weber et al. 1998). Eindeutige Korrelationen im Bezug auf die Prognose konnten noch in keinem der Tumoren festgestellt werden.

Knochenmorphogenesefaktor 7 (BMP-7)

BMP-7 (auch „osteogenic protein“ OP-1 genannt) verdankt seine Entdeckung vor allem der starken Knorpel- und Knocheninduktion (Urist 1965, Wozney et al. 1988, Celeste et al. 1990, Reddi 1997). Mangel an BMP-7 während der Embryonalphase führt zu multiplen Skelettanomalien (Kawabata et al. 1998). Null-Mutanten-Mäuse sterben aufgrund Differenzierungsdefekten an Auge und Niere (Dudley et al. 1995; Luo et al. 1995).

Wie alle BMPs ist BMP-7 an Zell-Zell-Interaktionen, Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe beteiligt. Dies ist besonders wichtig in der Entwicklung von Auge, Niere, Knochen und Zähnen. BMP-7 ist essentiell für die Stimulation, Differenzierung und Unterhaltung eines gesunden epithelialen Zelltypus (Simon et al. 1999). Es wird in epithelialen Karzinomzelllinien exprimiert und hemmt in pluripotenten embryonalen Karzinomzellen die Proliferation und stimuliert deren Differenzierung (Andrews et al. 1994, Hatakeyama et al. 1997). In Ratten-Osteosarkomen hemmt BMP-7 ebenfalls das Zellwachstum und führt als Zeichen der vermehrten Zelldifferenzierung zur Expression osteoblasten-typischer Marker (Knutsen et al. 1993).

1.2 Plattenepithelkarzinome der Lunge

Von den 250.000 Krebstoten pro Jahr in Deutschland gehen 35.000 Fälle auf das Konto des Bronchialkarzinomes. Darunter befinden sich ca. 28.000 Männer und 7.000 Frauen. Die Anzahl der weiblichen Erkrankten steigt im Gegensatz zu den Männern in den letzten Jahren weiter stetig an.

Nach der 2. revidierten WHO-Klassifikation teilt man die Lungentumoren histologisch ein (Tabelle 1.1).

	Häufigkeitsverteilung (Jöckel et al. 1995)	
	männlich	weiblich
1. SCLC („small cell lung cancer“): Kleinzelliges BC	23%	26%
2. NSCLC („non small cell lung cancer“): Nicht-Kleinzelliges BC		
a) Plattenepithelkarzinome	41%	23%
b) Adenokarzinome	25%	35%
c) großzellige Karzinome	18%	16%
d) kombinierte adenosquamöse Karzinome	selten	selten

Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation der Lungentumoren und ihre Häufigkeitsverteilung

Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf das Plattenepithelkarzinom, das mit 41% die häufigste Bronchialkarzinomvariante darstellt und auf das im besonderen eingegangen werden soll.

Epidemiologie

Der Lungenkrebs nimmt im letzten Lebensdrittel an Häufigkeit zu (etwa ab dem 55. Lebensjahr). Im Alter unter 30 ist er sehr selten. Es ist erwiesen, daß der Hauptrisikofaktor das Rauchen ist (Doll und Hill 1950). Während generell für Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern von einem um das 10fache erhöhte Risiko gesprochen werden kann, ist es bei Personen, die täglich mehr als 20 Zigaretten konsumieren auf das 20fache erhöht. Wurde vor dem 17. Lebensjahr begonnen, steigt das Risiko noch einmal um 50% (IARC 1986). Auch beim Passivrauchen muß von einer Risikoerhöhung von 1,35 gegenüber Nichtexponierten ausgegangen werden (Fontham et al. 1994; Stockwell et al. 1992; Jöckel et al. 1995).

Berufsbedingte Faktoren betreffen besonders Expositionen gegenüber Asbest, Arsen, Nickel, Chrom, Kadmium und Radon. Auffällig hierbei waren Kupferhüttenarbeiter mit Arsenexposition (Enterline et al. 1987) und Uranminenarbeiter aufgrund der Radonbelastung (Lubin et al. 1984). Bei Langzeitexposition gegenüber Mineralfasern, Zementstaub und Metallstäuben erhöht sich das Risiko auf das 2fache (Becher et al. 1992, Hoar et al. 1989, Pershagen et al. 1990).

Bei den Umweltfaktoren (Dieselabgase, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) geht man von ca. 5-10 Lungenkrebsfällen pro 100.000 Personen pro Jahr in stark belasteten Gebieten aus (Pershagen et al. 1990). Eine Risikoabschätzung zur Radon-Innenraumbelastung ergab ca. 2000 Todesfälle pro Jahr in den alten Bundesländern (Steindorf et al. 1995).

Auch Ernährungsgewohnheiten spielen eine Rolle. Geringer Obst- und Gemüseverzehr und übermäßiger Fettkonsum erhöhen das Lungenkrebsrisiko (Steinmetz und Potter 1991).

Zytogenetische und molekularbiologische Veränderungen in der Entwicklung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

Bei der Entwicklung des Bronchialkarzinoms spielen molekulargenetische Ereignisse eine entscheidende Rolle. Eine Akkumulation genetischer Schäden kann parallel zu den morphologisch definierbaren Stadien (Bronchial-/Alveolarepithel → Hyperplasie/Dysplasie → präinvasiv/invasiv/metastatisch wachsendes Karzinom) nachgewiesen werden (Übersicht in De Vita et al. 1993, Roth et al. 1993).

Es handelt sich hierbei um eine sukzessive Schädigung von Genen, die direkt oder indirekt Wachstum, Proliferation oder Differenzierung der Zelle positiv oder negativ regulieren: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Dabei sind eine Vielzahl unterschiedlicher genetischer Alterationen (siehe Tabelle 1.2) dokumentiert (Übersicht bei Wiethage et al. 1994).

Onkogen/Tumorsuppressorgen	Chromosomale Lokalisation	Genetische Alteration	Bevorzugte Histologie	Prognostische Aussage
<i>ras</i> -Familie <i>Rat Sarcoma Virus = MuSV</i> <i>N-ras</i> Neuroblastoma <i>H-ras</i> Harvey-MuSV <i>K-ras</i> Kirsten-MuSV	1p13 11p15.5 12p12.1	Punktmutation	(Nichtkleinzellige Karzinome) Adenokarzinom	Negativ
<i>erbB-1</i> (EGFR) Erythroblastosis Virus (Epidermal Growth Factor Receptor)	7p13-p12	Überexpression	Plattenepithelkarzinom	Negativ
<i>erbB-2</i> (HER 2) Erythroblastosis Virus	17q21-q22	Überexpression	Adenokarzinom	Negativ
<i>fos</i> Finkel osteosarcoma virus	14q24.3	Überexpression	Nichtkleinzellige und kleinzellige Karzinome	Negativ bei Plattenepithelkarzinom
<i>jun</i> avian sarcoma virus 17	1p32-p31	Überexpression	Nichtkleinzellige und kleinzellige Karzinome	Negativ bei Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom
<i>bcl-2</i> B cell leukaemia/lymphoma	18q21	Überexpression Akkumulation	Nichtkleinzellige und kleinzellige Karzinome	Positiv
<i>mdm2</i> murine double iminute 2	12q13-q14	Überexpression	Nichtkleinzellige und kleinzellige Karzinome	
<i>mts</i> -Familie Multiple Tumor Suppressor <i>mts1</i> (p16INK4/CDKN2) <i>mts2</i> (p15INK4R)	9p21 9p21	Gendeletion Punktmutation	Nichtkleinzellige Karzinome Metastasen Primärtumor	
<i>p53</i> Protein 53.000 dalton	17p31	Punktmutation	Nichtkleinzellige und kleinzellige Karzinome	Negativ

Tabelle 1.2: Onko-, Tumorsuppressorgen-Veränderungen in NSCLC (Der Onkologe 1995)

Bei zytogenetischen Untersuchungen fanden sich neben numerischen Aberrationen (vor allem Chromosom-7-Trisomie) wiederholt Bruchpunkte der Chromosomen 1,3,6,7,8,11,13,15,17 und 19 (Testa und Siegfried 1992). Dabei kommt es meist zu einem Informationsverlust (Deletion). Welche Gene dabei betroffen sind, ist noch nicht geklärt.

Zu aktivierten Onkogenen kommt es entweder durch Amplifikation, Überexpression oder durch Punktmutationen. Deren Produkte greifen an proliferations- und differenzierungsbezogenen Signaltransduktionswegen an.

ErbB-1 kodiert den „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR). Bevorzugt in Plattenepithelkarzinomen ist die Expression um bis zum 50fachen erhöht. Dies zieht eine schlechtere Prognose nach sich (Gazdar 1990).

Das Protoonkogen *erbB-2* (*HER2/neu*) kodiert für einen Oberflächen-Rezeptor mit hoher Homologie zum EGFR. Seine Überexpression beruht auf einer erhöhten mRNA-Stabilität vor allem in Adenokarzinomen und ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Kern et al. 1988).

Tumorsuppressorgene stellen bedeutende Kontrolleure des Zellzyklusprogrammes dar. Sie garantieren genomische Integrität und sind funktionell an der Zellverankerung beteiligt. Damit stehen sie einer Tumorentstehung und klonalen Ausbreitung entgegen.

Das *p53*-Gen ist bei menschlichen Tumoren das am häufigsten mutierte Gen (Hollstein et al. 1991). In NSCLC finden sich in weit mehr als 50% Veränderungen auf Genomebene (Iggo et al. 1990, Wiethage et al. 1995). In der Mehrzahl handelt es sich dabei um Punktmutationen in kritischen Abschnitten (sog. „hot spots“). Da *p53* ein Schlüsselmolekül in der Reaktion der Zelle auf DNA-Schädigung ist, werden nach einer Mutation DNA-veränderte Zellen nicht mehr in ihrer Proliferation gehemmt, wodurch es zu weiteren genetischen Veränderungen kommen kann. Aufgrund der sehr kurzen Plasmahalbwertszeit von normalem Wildtyp-*p53* spricht der intrazelluläre Nachweis akkumulierten *p53*-Proteins für eine Mutation (Müller et al. 1995). Diese Veränderung ist auch schon in präneoplastisch-dysplastischem Gewebe nachweisbar (Benett et al. 1993). Die Prognose ist bei Patienten mit positivem *p53*-Befund deutlich schlechter als bei einem negativen Befund (Iggo et al. 1990).

Die *mts*-Familie gehört ebenfalls zu den Tumorsuppressorgen. *mts-1* kodiert ein Protein mit 16 kDa, *mts-2* ein Protein mit 15 kDa. Alterationen beider Gene konnten in NSCLC nachgewiesen werden, wobei *mts-2*-Mutationen in den Primärtumoren, *mts-1*-Mutationen nur in den Metastasen festgestellt wurden (Okamoto et al. 1995). Die genaue Funktion wird noch widersprüchlich diskutiert.

Einteilung und Prognose

Karzinome der Lunge werden nach den UICC-Kriterien klassifiziert (Tabelle 1.3).

Für die Prognose ist neben dem histopathologischen Befund besonders der prä- und postoperative Lymphknotenstatus von großer Bedeutung. Es sind zunächst die regionären intrapulmonalen und hiliären Lymphknoten beteiligt. Bei Untersuchungen des Obduktionsgutes waren diese in 82,5% der Fälle betroffen. 57% hatten bereits in mediastinale Lymphknoten abgesiedelt (Müller et al. 1995). Lymphknotenmanifestationen führen zu einer starken Verringerung der Überlebenszeit. Tumorabsiedlungen in mediastinale Lymphknoten stellen dabei einen wichtigen Prognosefaktor dar (Mountain 1986).

5-Jahres-Überlebenszeit:

(Mountain 1986)

Stadium I: 36 – 62%

Stadium II: 23 – 34%

Stadium III: 5 – 8%

Stadium IV: 2%

Die Prognose wird dabei entscheidend von Lokalrezidiven und Fernmetastasen, besonders bei fortgeschrittenen Stadien, beeinflusst.

T Primärtumor	Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder positive Zytologie, jedoch Tumor radiologisch und bronchoskopisch nicht sichtbar
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor 3cm oder weniger, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus frei
	T2	Tumor > 3cm oder Befall des Hauptbronchus oder der viszeralen Pleura oder assoziierte Atelektasen bzw. obstruktive Entzündungen
	T3	Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand, Zwerchfell, Perikard, mediastinale Pleura u.a. oder totale Atelektase
	T4	Infiltration einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, Trachea, große Gefäße, Speiseröhre u.a. oder maligner Erguß
N Regionäre Lymphknoten	Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (LK)
	N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen LK und/oder in ipsilateralen Hilus-LK
	N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen LK
	N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären LK
M Fernmetastasen	Mx	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden.
	M1	Keine Fernmetastasen
	M2	Fernmetastasen
G Histopathologisches Grading	Gx	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden.
	G1	Gut differenziert
	G2	Mäßig differenziert
	G3	Schlecht differenziert
	G4	Undifferenziert
Stadieneinteilung	0	Tis, N0, M0
	I	T1 oder T2, N0, M0
	II	T1 oder T2, N1, M0
	IIIA	T1 oder T2, N2, M0 oder T3, N0/N1/N2, M0
	IIIB	jedes T3, N3, M0 oder T4, jedes N, M0
	IV	jedes T, jedes N, M1

Tabelle 1.3: UICC-Kriterien 1993

1.3 Zielsetzung der Untersuchungen

Wie oben bereits erwähnt, spielen BMPs eine wichtige Rolle in der Embryogenese. Da es in Tumorzellen häufig zu Veränderungen kommt, die denen der embryonalen Entwicklung sehr ähnlich sind, wird postuliert, daß BMPs auch in der Tumorgenese eine Rolle spielen.

Untersucht werden sollte besonders das BMP-7, wobei wir uns auf das häufige Plattenepithelkarzinom der Lunge konzentriert haben. Diese Entscheidung liegt einmal darin begründet, daß BMP-7 von unserer Arbeitsgruppe schon in Mamma- und Ösophaguskarzinomen nachgewiesen werden konnte und daß es einen Zusammenhang zwischen BMP-7 und der Differenzierung bzw. Verhornung eines Tumors gibt. Andererseits spielen gerade in der Lunge die Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Geweben eine große Rolle. Die ausschließliche Untersuchung der plattenepithelialen Differenzierung des Bronchialkarzinoms fußt in der Tatsache, daß BMP-7 und BMP-6 eine wichtige Rolle in der Keratinisierung epithelialer Zellen spielen.

Es sollte eruiert werden, ob BMP-7 auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene in Tumorgewebe vorkommt und ob es dabei Unterschiede zum korrespondierenden Normalgewebe gibt. Weiterhin soll die Untersuchung klären, ob es Anzeichen dafür gibt, daß der BMP-7-mRNA-Expressionsgrad oder der BMP-7-Proteingehalt die Charakteristika des entsprechenden Tumores in irgendeiner Hinsicht beeinflussen und ob diese mit anderen Signalwegen wie zum Beispiel dem EGFR-Signalweg in einer regulatorischen Verbindung stehen.

II. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Für alle Untersuchungen wurde Routinematerial des Institutes für Pathologie Bad Berka der Jahre 1996/97 von Herrn Dr. A. Schmidt und Herrn Dr. J. Sänger zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Gewebeproben aus Resektionspräparaten der Lunge (Lobektomien und Segmentresektionen). Ein Teil der entnommenen Proben wurde sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Ein weiterer Teil wurde in Paraffin eingebettet. Das Gefriermaterial wurde zur RNA-Isolierung mit nachfolgender RT-PCR eingesetzt, das Paraffinmaterial wurde geschnitten und zur histologischen und immunhistologischen Begutachtung genutzt.

Bei allen 46 zufällig ausgewählten Patienten (siehe Tabelle 2.1) handelte es sich um histologisch und makroskopisch von zwei Pathologen unabhängig befundene Plattenepithelkarzinome der Lunge. Die Tumorproben stammten aus den tumorös veränderten Arealen des operativen Resektates, die korrespondierenden Normalproben aus dem tumorfreien Resektionsrand.

Entnahmedatum	1996: 69,6 % (32/46) 1997: 30,4 % (14/46)		
Geschlechtsverteilung	weiblich 15,2 % (7/46) männlich 84,8 % (39/46)		
Durchschnittsalter	64 Jahre (52 - 73 Jahre)		
pT-Status	pT1 2,2 % (1/46) pT2 63,0 % (29/46) pT3 30,4 % (14/46) pT4 4,4 % (2/46)		
pN-Status	pN0 45,7% (21/46) pN1 45,7 % (21/46) pN2 10,7 % (5/46)		
pM-Status	pMx 100 % (46/46)		
Histologisches Grading	Grad 1 47,8 % (22/46) Grad 3 19,6 % (9/46) Grad 2 30,4 % (14/46) Grad 4 2,2 % (1/46)		
Verhornungsgrad	verhornend 39,1 % (18/46) teilverhornend 13,0 % (6/46) nicht-verhornend 47,8 % (24/46)		

Tabelle 2.1: Daten des Untersuchungskollektives

2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieser erlaubt die Gewinnung von RNA-Molekülen, die mehr als 200 Basenpaare lang sind. Zur Materialgewinnung wurden jeweils drei ca. 4 mm² große Stückchen aus unterschiedlichen Arealen der zuvor in der Mitte geteilten tiefgefrorenen Gewebe (Tumor- und Normalgewebeprobe) mit einem Einmal-Skalpell abgetrennt und sofort in vorbereitete Eppendorf-Gefäße (auf Eis) überführt, in denen sich 500 µl Lyse-Puffer RLT + 5 µl 1%iges β-Mercaptoethanol befand. Dabei wurde bei der Tumorgewebeprobe streng darauf geachtet, daß die Materialentnahme nur auf den makroskopisch erkennbaren Tumor beschränkt war.

Die Gewebestückchen wurden danach mit einem Handmörser (Wheaton Scientific, Millville, U.S.A.) zerkleinert, um die Angriffsfläche des Lysepuffers zu vergrößern. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Zelllysate wurde durch einen Filter (Qias shredder Spin Column) für 2 Min. bei 14000 U/min (Eppendorf Centrifuge 5415 C) zentrifugiert. Dem Eluat wurden 500 µl 70%iges Ethanol zugegeben, gemischt und für 15 Sek. bei 10000 U/min durch eine Silica-Gel-Membran (RNeasy Spin Column) zentrifugiert. Darauf folgten mehrere Waschschrte: 500 µl RW1-Puffer für 10 Min. - 15 Sek. bei 10000 U/min zentrifugieren - 500 µl RPE-Puffer zugeben - 15 Sek. bei 10000 U/min zentrifugieren - nochmals 500 µl RWE-Puffer zugeben - 2 Min. 10000 U/min zentrifugieren. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl RNase-freiem destilliertem Wasser unter Zentrifugation (60 Sek. bei 10000 U/min). Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert oder meist der sofortigen cDNA-Synthese zugeführt.

2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der Synthese komplementärer DNA (cDNA) wird die Eigenschaft der Reversen Transkriptase genutzt, eine RNA-Matrize komplementär in einen DNA-Strang umschreiben zu können.

Zunächst wurde die gewonnene RNA (1 µg) für 5 Min. bei 65 °C im Wasserbad erhitzt.

Danach Zugabe des Reaktionsmixes (11,5 µl), der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte (Mengenangaben jeweils für eine RNA-Probe):

- 4 µl 5x Reaktionspuffer
 - 2 µl DTT (0,1 M)
 - 2 µl dNTP-Gemisch (jeweils 10 µM dATP, dCTP, dGTP und TTP)
 - 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,2 mg/ml)
 - 1 µl Random-Primer (0,2 mg/ml)
 - 0,5 µl RNasin (20 U)
 - 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (GIBCO-BRL, Eggenstein)
- = 11,5 µl/Probe

Mit DEPC-Wasser wurde auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 Min. bei Raumtemperatur und 40 Min. bei 37 °C im Brutschrank folgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase im Wasserbad bei 95 °C für 8 Min. Die synthetisierte cDNA wurde bei –80 °C gelagert.

2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Welcher Abschnitt der Nukleinsäurekette dabei amplifiziert wird, wird durch die Auswahl bestimmter Primer (sense und anti-sense Richtung) festgelegt.

Mit der PCR ist eine semiquantitative Analyse des Gehaltes bestimmter cDNA-Sequenzen in einem Reaktionsansatz möglich.

Die unter Schritt 2.3 hergestellte cDNA wurde in die PCR eingesetzt. Dabei kamen verschiedene Primer zum Einsatz (siehe Tabelle 2.3).

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (Angaben je Probe):

- 18,3 µl Aqua dest (steril)
 - 2,5 µl 10x PCR-Puffer
 - 2,0 µl dNTP-Gemisch (jeweils 2,5 µM dATP, dCTP, dGTP, TTP)
 - 1,0 µl Primer-Gemisch (10 µM)
 - 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl; Qiagen, Hilden)
- = 24 µl / Probe

Diese Komponenten wurden bis auf die Taq-Polymerase auf Eis vorgemischt und zu 1,5 µl cDNA, die sich bereits in Eppendorf-Reaktionsgefäßen befand, hinzugegeben. Danach wurde die Taq-Polymerase zupipettiert. Parallel zu den Proben wurde eine Kontrolle mitgeführt, in der die cDNA durch Aqua dest. ausgetauscht war. Die Reaktionsgefäße wurden kurz

abzentrifugiert und in einen TRIO-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit beheiztem Deckel eingesetzt.

Es folgte der Start des für das verwendete Primerpaar spezifischen Programmes:

Alle Programme begannen mit einer initialen Denaturierung (95 °C, 3 Min.) und schlossen mit einer terminalen Elongation (72°C, 5 Min.). Dazwischen führte der Thermocycler eine Schleife aus, deren Programm-Daten für die unterschiedlichen Primer verschieden waren (siehe Tab. 2.2). Am Ende wurden die Proben bis zur manuellen Beendigung der Programme auf 4 °C heruntergekühlt.

Die Sequenz, die Position auf der publizierten Sequenz und die erwartete Größe der PCR-Ürodukte sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

<u>Primer</u>	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
β-Aktin	95°C, 30 Sek.	61 °C, 30 Sek.	74 °C, 20 Sek.	28
BMP-1	95°C, 30 Sek.	66 °C, 20 Sek	72 °C, 25 Sek.	34
BMP-4	95°C, 30 Sek.	61 °C, 30 Sek	72 °C, 30 Sek.	29
BMP-7	95°C, 30 Sek.	65 °C, 30 Sek	72 °C, 30 Sek.	34
ERBB1	95°C, 30 Sek.	60 °C, 30 Sek	72 °C, 20 Sek.	34
ERBB2	95°C, 30 Sek.	65 °C, 30 Sek	72 °C, 20 Sek.	34
ERBB4	95°C, 30 Sek.	60 °C, 30 Sek	72 °C, 20 Sek.	34



Tabelle 2.2: PCR-Programm-Daten zur Inkubation im Thermocycler

Primer	Position	Primärsequenz	Größe
β-AKTIN	5' 657 ---> 1369 3' Genbanknr.: X00351	5' CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT 3' 3' GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC 5'	712 bp
BMP-1	5' 1468 ---> 1754 3' Genbanknr.: M22488	5' TTG AGA TTG AGC GCC ACG ACA GC 3' 3' TCA CAG CTG CAC TTG TAG CTG CC 5'	286 bp
BMP-4	5' 1003 ---> 1349 3' Genbanknr.: M22490	5' ACT GGT CCA CCA CAA TGT GAC ACG 3' 3' GCT GAA GTC CAC ATA GAG CGA GTG 5'	346 bp
BMP-7	5' 407 ---> 985 3' Genbanknr.: M60316	5' CCT ACC CCT ACA AGG CCG TCT TC 3' 3' TGC TCC CCG TGG ACC GGA TGC TG 5'	578 bp
ERBB1	5' 295 ---> 733 3' Genbanknr.: X00588	5' AAG CTC ACG CAG TTG GGC AC 3' 3' GGT TCT GGA AGT CCA TCG AC 5'	438 bp
ERBB2	5' 363 ---> 745 3' Genbanknr.: X03363	5' CTA CCT GCC CAC CAA TGC CA 3' 3' CCC GAG AGC GGT TGG TGT CT 5'	382 bp
ERBB4	5' 93 ---> 640 3' Genbanknr.: L07868	5' CCA GCC CAG CGA TTC TCA GT 3' 3' TTT CTG TGG GTC CCC AGC AA 5'	547 bp

Tabelle 2.3: Charakteristika der eingesetzten Primer

2.2.4 Analyse der PCR-Produkte

Der Nachweis und die erste Analyse der PCR-Produkte erfolgte über ein Agarose-Gel. Hierzu wurde 1 g Agarose (Agarose ultra pure, GIBCO BRL, Eggenfelden) auf 100 ml 1x-TAE-Puffer (Ansatz 50-fach: Trisbase 242 g, Eisessig 57,1 ml, EDTA [0,5 M pH 8,0] 100 ml; auf 1 Liter mit Aqua dest aufgefüllt und autoklaviert) eingewogen. Darauf folgte das Aufkochen der Lösung in der Mikrowelle (Bosch, Stuttgart) für ca. 30 Min. bei 180 Watt, so daß die Agaroselösung schlierenfrei gelöst vorlag.

Je 100 ml abgekühlte Gellösung wurden 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zupipettiert und diese dann in horizontale Gießkammern gegossen, deren Kamm 22 Probetaschen für das Auftragen freihielt.

Das Gel samt Gießtablett wurde in die mit 1xTAE-Puffer befüllte Gelkammer gelegt, wobei das Gel vollständig von Puffer bedeckt war. Auf Parafilm wurden 10 µl Probenpuffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,0] 1 ml; 1 mM Na₂-EDTA 200 µl; 0,1 % SDS 500 µl; 30 % Glycerin 30 ml; 0,0025 % Bromphenolblau 62,5 µl; mit Wasser auf 100 ml auffüllen) vorgelegt, mit 15 µl PCR-Produkt mit der Pipette gemischt und in jeweils eine Tasche übertragen.

Nach dem Auftrag der Proben und des Markers (10 µl 1 kb DNA-Ladder, GIBCO BRL, Eggenstein) zur Molekulargewichtsbestimmung erfolgte der Gellauf bei 200 mA (Powergerät

LKB 2103 Power Supply, Pharmacia, Heidelberg). Danach wurde das Gel mittels eines UV-Transilluminators und eines Videokamera-basierenden Computersystems (EASY-System, Herolab, Wiesloch) dokumentiert und die einzelnen Banden-Intensitäten densitometrisch vermessen.

2.2.5 Semiquantitative Auswertung

Die verschiedenen Bandenintensitäten wurden zuerst einer visuellen Abschätzung durch zwei unabhängige Personen unterzogen. Dabei wurde eine sichtbare Bande mit „1“ bewertet, eine nicht nachweisbare mit „0“. Waren sowohl die Tumor- als auch die Normalgewebeprobe zu eruieren, wurde der stärkeren Bande das Attribut „2“ verliehen (zum Beispiel 2-1 oder 0-1).

Da der mRNA-Gehalt der verschiedenen Gewebeproben meist unterschiedlich war, sollte ein zusätzlicher Vergleich durchgeführt werden, der diese Unterschiede stärker berücksichtigte. So mußte eine Quotientenbildung stattfinden, in die das House-keeping-Gen β -Aktin als Basis miteinflöß.

β -Aktin-mRNA ist in jeder Zelle in einem vergleichbarem Anteil vorhanden. Es läßt sich deshalb anhand der Stärke der β -Aktin-mRNA-Bande die in die RT-PCR eingesetzte mRNA-Quantität abschätzen.

Aus diesem Grund wurden die Banden neben der visuellen Beurteilung densitometrisch videobasiert vermessen (Herolab E.A.S.Y. 420K, E.A.S.Y.-Auswertung, Wiesloch). Jede Bande erhielt einen vom Auswertungssystem errechneten Zahlenwert, der ihrer Intensität entsprach. Dabei waren 3 Gruppen zu unterscheiden: Die 1. Gruppe beinhaltete die Banden, denen das Meßsystem einen Zahlenwert in Abhängigkeit der errechneten Intensitäten zuwies. In der 2. Gruppe befanden sich die Banden, die zwar visuell nachweisbar, jedoch für die Sensitivität des kameragestützten Auswertungssystems zu schwach waren. In der 3. Gruppe befanden sich die negativen Proben, bei denen weder visuell noch computergestützt eine Bande zu erkennen war.

Um die Werte der Gruppe 2, die unterhalb der densitometrischen Nachweisgrenze lagen, mit in die Auswertung einbeziehen zu können, bekamen diese den Wert der schwächsten noch gemessenen Bande aller Proben der entsprechenden Kategorie (zum Beispiel aller Tumor-BMP-7-Banden).

Bei Werten der Gruppe 3, zu denen nur Normalgewebeproben zählten, wurde nach demselben Prinzip verfahren. Dies war nötig, da im Zuge der Quotienten-Bildung nicht durch „Null“

dividiert werden durfte. Dies schränkte jedoch den Aussagewert der BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten nicht wesentlich ein, da diese vor allem von der BMP-7-mRNA-Überexpression der Tumorbanden dominiert wurde.

Die densitometrischen β -Aktin-Werte der Tumorprobe wurden durch die der Normalprobe dividiert. Damit besaß man einen Wert, der angab, in welchem Verhältnis der Gehalt an mRNA der Tumorprobe zum Gehalt der Normalprobe stand. Dasselbe geschah mit den gemessenen Werten für BMP-7 und EGFR. Diese beiden Quotienten wurden wiederum durcheinander geteilt (BMP-7- oder EGFR- durch die Aktinwerte). Man erhielt so den BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten bzw. den EGFR-Tumor/Normal-Quotienten, die ohne Abhängigkeit vom absoluten mRNA-Gehalt der Probe die Aussage zuließen, um wieviel mal mehr oder weniger (bei Werten größer bzw. kleiner 1) BMP-7-/EGFR-mRNA in der Tumorprobe im Vergleich zur Normalprobe vorhanden war:

$$\text{BMP-7-Vergleichssquotient} = \frac{\text{BMP-7-Intensität (Tumor)}}{\text{BMP-7-Intensität (Normal)}} \bigg/ \frac{\beta\text{-Aktin-Intensität (Tumor)}}{\beta\text{-Aktin-Intensität (Normal)}}$$

$$\text{EGFR-Vergleichssquotient} = \frac{\text{EGFR-Intensität (Tumor)}}{\text{EGFR-Intensität (Normal)}} \bigg/ \frac{\beta\text{-Aktin-Intensität (Tumor)}}{\beta\text{-Aktin-Intensität (Normal)}}$$

2.3 Immunhistologie

Immunhistologische Verfahren erlauben es, mittels Antikörper-Antigen-Reaktionen einzelne Antigene hochspezifisch an ihrem jeweiligen Aufenthaltsort in Gewebsschnitten nachzuweisen.

Es wurden zu Beginn Paraffinschnitte der entsprechenden Gewebeproben auf adhäsiven Objektträgern (Super-FrostPlus, Firma Menzel) angefertigt.

Nach kurzzeitigem Erhitzen (2 Min.) auf einer 70 °C heißen Heizplatte wurden die Objektträger dann durch zweimaliges Inkubieren (2x 10 Min.) in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (in 96%igem Alkohol 2x 5 Min., in 70%igem Alkohol 1x 10 Min) rehydratisiert. Es folgte ein Spülen in PBS (0,05M Phosphatpuffer pH 7,5, 0,15M NaCl) für 3 x 5 Min. (jeweiliges Umsetzen der Objektträger in frisches PBS). Daraufhin wurden die Schnitte in einem Plastikgefäß mit leicht aufgesetztem Deckel, welches mit Citratpuffer (0,01 mol/l; pH 6,0) gefüllt war, in der Mikrowelle für 4 Min. bei 520 W und anschließend bei 400 W für 12 Min. erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten. Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Objektträger für 30 Min. in 0,05%ige H₂O₂-Lösung (H₂O₂-Lösung in PBS) gestellt. Danach wieder 3x 5 Min. PBS-Spülung. Um unspezifische Bindungen zwischen hydrophoben Gewebsproteinen und dem Antikörper zu verhindern, werden diese Bindungsstellen mit Normalserum geblockt.

Das in 40 µl-Portionen bei -20°C eingefrorene Pferd-Normalserum wurde dafür mit jeweils 1,5 ml PBS gemischt. Nach dem zügigen Trockentupfen der Objektträger mit Filterpapier wurde jeder Schnitt mit ungefähr 100 µl Serum-/PBS-Gemisch vollständig bedeckt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 Min. wurde das Serum-/PBS-Gemisch vom Schnitt abgeklopft und mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Ziege-Antikörper gegen BMP-7 (goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg) und gegen EGFR (EGF-Receptor -AB-4, Oncogene Science, Dianova, Hamburg) verwendet. Vor ihrer Verwendung wurden diese 50fach mit einer 1%igen Rinderserum-Albumin(RSA)-Lösung (Gamma-globulinfreies RSA in 0,05 M Tris/HCl, pH 7,6; 0,05 % Tween 20; 1 mg/ml Natriumazid) verdünnt. Jeder Schnitt wurde mit circa 100 µl BMP-7-/EGFR-Antikörper-Lösung vollständig bedeckt und für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 min in PBS gespült.

Als Sekundärantikörper wurde ein 1:200 verdünnter biotinylierter Antikörper (Pferd-anti-Ziege, Vector, Burlington) angewandt. Dieser Antikörper war in 4 µl-Portionen bei -20°C eingefroren und wurde jeweils mit 100 µl RSA-Lösung und 700 µl PBS verdünnt. Jeder Schnitt wurde mit ca. 100 µl verdünntem Sekundär-Antikörper vollständig bedeckt und wiederum für 30 Min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Spülen in PBS 3x 5 Min.

Danach wurde ein ABC-Kit zum Nachweis verwendet (Vectastain® Elite ABC-Kit, Vector, Burlington). Mindestens 30 Min. vor Anwendung wurde das Reagenz hergestellt, indem 20 µl Lösung A und 20 µl Lösung B zu 1 ml PBS pipettiert wurden. Dadurch bildeten sich makromolekulare Komplexe, bestehend aus Avidin und biotinylierter Peroxidase. Jeder Schnitt wurde mit circa 100 µl ABC-Reagenz vollständig bedeckt und für 30 Min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 min in PBS gespült und abgeklopft.

Die Schnitte wurden vollständig mit 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (1,5 µmol/l DAB, 10 mmol/l H₂O₂ und 0,05 M PBS, pH 7,5) bedeckt und für 7 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Färbeserien zu standardisieren, wurde diese Zeit mit der Stoppuhr gemessen. Das Abstoppen der Färbung erfolgte durch 2faches Spülen der Präparate in destilliertem Wasser.

Eine Kerngegenfärbung erfolgte in Harri's-Hämalaun, worin die Schnitte für 5 Sek. geschwenkt wurden. Danach erfolgte das Spülen in destilliertem Wasser und das Bläuen in Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (in 70%igem Alkohol 1 x 10 min, in 97%igem Alkohol 2 x 5 min) und in Xylol (2 x 5 min) entwässert und eingedeckelt.

Eine halbautomatische Auswertung der immunhistologischen Präparate erfolgte an einem Mikroskop (Jenalumar, Zeiss, Jena, Objektiv: Planapochromat 25x /0,65, Durchlicht) über ein Bildauswertesystem. Das System verfügte über eine 3 CCD-Farbkamera (Sony DXC-930 P) sowie Framegrabber (VISIONplus-AT, Imaging Technology Inc., Bedford) und verwendete eine kommerzielle Software (OPTIMAS, Bioscan Inc. Edmonds). Für die spezielle Anwendung der Auswertung immunhistologischer Präparate wurde ein Makroprogramm von Herrn Tympel (Ingenieurbüro, Tympel, Jena) erstellt. Das Programm nutzte die Ausgangssignale der grünen (für die spezifische Immunreaktion, Diaminobenzidin) und roten Farbkanäle (blaue Kerngegenfärbung, Hämalaun) der Kamera und erstellte ein digitalisiertes Farbbild auf dem Bildschirm welches eine separate

Auswertung der Farbkomponenten über die Grauwerte eines konvertierten Schwarz/Weißbildes gestattete.

Dabei konnte der Schwellwert der meßtechnischen Erfassung interaktiv vom Auswerter für die einzelnen Farbkomponenten so eingestellt werden, daß der Grad der spezifischen Färbung dem Markierungsgrad im Präparat entsprach. Um den subjektiven Fehler, der aus dieser Vorgehensweise resultierte, zu minimieren, wurde diese Schwellwerteinstellung für eine Versuchsreihe nicht weiter verändert, das heißt, alle Präparate einer Versuchsserie wurden mit der gleichen Schwellwerteinstellung automatisch vermessen. Als Meßwerte wurden die Anzahl der positiven braunen Bildpunkte (DAB-Färbung) mit den blauen (Kernanteil) ins Verhältnis gesetzt, der Mittelwert und die Standardabweichung der Meßwerte in Prozent wurden als Resultat ausgegeben.

2.4 Statistik

Für alle statistischen Berechnungen wurde das Statistikprogramm SPSS Version 10 benutzt. Dabei kamen folgende Funktionen zur Anwendung:

Um die Verteilung der errechneten Tumor/Normal-Quotienten zwischen verschiedenen klinischen Parametern (zum Beispiel pN, Verhornung, histologisches Grading) zu visualisieren, wurde sich der Boxplot-Funktion bedient. Ob dabei ein signifikanter Unterschied bestand, sollte mit dem Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben untersucht werden.

Zur Berechnung der Regressionsgeraden zwischen den Tumor/Normal-Quotienten der beiden Faktoren BMP-7 und EGFR wurde die bivariate Pearson-Korrelation genutzt.

Anhand dieser beiden statistischen Verfahren wurden alle uns zur Verfügung stehenden Daten auf mögliche Abhängigkeiten untersucht.

III. Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurden verschiedene Proteine anhand ihres mRNA-Gehaltes sowohl im Tumor als auch im korrespondierenden Normalgewebe untersucht.

In einem zweiten wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich Tumor und Normalgewebe in ihrem Gehalt an diesen Proteinen unterschieden.

Ob diese Daten vergleichbar sind und ob die Ergebnisse etwas über den Charakter der Neoplasie aussagen, sollte im dritten Schritt geklärt werden.

3.1 Untersuchungen auf mRNA-Ebene

Das Untersuchungsmaterial bestand aus Gewebeproben von 46 Patienten, die zwischen 1996 und 1997 an einem Plattenepithelkarzinom der Lunge operiert wurden. Diese Proben standen uns als Gefriermaterial zur Verfügung.

Aus 46 Tumoren und den korrespondierenden Normalgeweben wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR auf die Expression von verschiedenen Genen hin untersucht. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und semiquantitativ (densitometrisch) ausgemessen. Die Intensität einer Gel-Bande, die anhand ihrer Größe zuzuordnen ist, entspricht dabei der DNA-Menge, die während der PCR-Amplifikation zwischen den spezifischen Primern (sense- und antisense-Richtung) gebildet wird. Diese korreliert mit dem Gehalt dieses Sequenzabschnittes in der eingesetzten cDNA und damit der Expression des untersuchten Proteins in der Gewebeprobe.

Zuerst wurde mit jeder cDNA eine β -Aktin-PCR durchgeführt. Dies diente dem Abschätzen der cDNA-Konzentration und dem Überprüfen der Integrität der Proben.

Begonnen wurde mit 14 Gewebepaaren, um einen ersten Einblick in die Expression der ausgewählten Proteine in Bronchialkarzinomen zu erhalten.

Folgende Faktoren wurden untersucht: BMP-1, BMP-4, BMP-7, erbB-2, erbB-4 und EGFR. BMP-4 und BMP-7 spielen eine Rolle in der Differenzierung der Lunge (King et al. 1994, Bitgood und McMahon 1995, Bellusci et al. 1996) und wurden schon in vielen Tumoren nachgewiesen (siehe Einleitung). Hinsichtlich dieser BMP-Proteine liegen schon Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe z.B. in Mammakarzinomen (Schwalbe 2000) und Ösophaguskarzinomen (Raida et al. 1999) vor. BMP-1, eine extrazelluläre Proteinase, vermittelt die Aktivierung von BMP-Proteinen, beteiligt sich an Zell-Matrix-Interaktionen, an der Organmorphogenese und der Wundheilung (Kessler et al. 1996). ErbB-1 (EGFR), erbB-2

werden in Lungentumoren meist überexprimiert und haben somit Einfluß auf die prognostische Charakterisierung des Tumors (Wiethage et al. 1994). Darüber hinaus wird eine Verbindung zwischen dem erbB- und dem BMP-Signalweg angenommen (Kretzschmar et al. 1997, Ghosh Choudhury et al. 1999, Clement et al. 1999).

Für die Untersuchungen standen spezifische PCR-Primer (sense und antisense) zur Verfügung, deren Amplifikationsprodukte folgende Längen aufwiesen:

- | | | | |
|--------------------------|-----------------|------------------|----------------|
| - β -Aktin: 712 bp | - BMP-4: 346 bp | - erbB-2: 382 bp | - EGFR: 738 bp |
| - BMP-1: 286 bp | - BMP-7: 578 bp | - erbB-4: 547 bp | |

Die Banden-Intensitäten wurden visuell von zwei unabhängigen Personen ausgewertet (Tabelle 3.1 und 3.2). Dabei ging man nach folgenden Kriterien vor: Es wurde untersucht, ob sich die Banden nachweisen ließen. Wenn dies der Fall war, wurden die Banden der Tumor- und der Normalgewebeprobe verglichen.

Der BMP-1-mRNA-Gehalt war gleich (7/14) oder höher (6/14) im Tumor- versus im Normalgewebe, während sich kein Fall ergab, der eine umgekehrte Konstellation zeigte (0/14).

Die BMP-4-mRNA-Expression zeigte sich im Tumor höher (10/14) als im Normalgewebe. Drei Probenpaare waren gleich; eines wies eine höhere Expression im Normalgewebe auf.

Im bezug auf die erbB-2-Ergebnisse wurde eine meist höhere (8/14) oder gleich große (5/14) Expression in den Tumoren gegenüber dem Normalgewebe festgestellt.

Bei erbB-4 konnte eine geringe Expression in den Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe (7/14) verzeichnet werden. Es waren jeweils nur drei Tumorproben vertreten, die eine stärkere oder gleiche Expression zeigten.

Bei BMP-7 ergab sich ein starkes Übergewicht der Expression zugunsten der Tumorproben. Von 14 untersuchten Paaren stellte sich in 13 Fällen die BMP-7-mRNA-Expression in den Tumoren als höher dar. Tendenziell konnte mit Ausnahme des erbB-4 bei allen untersuchten Faktoren eine erhöhte Expression der entsprechenden mRNA festgestellt werden. Bei erbB1 und erbB-2 ist eine Überexpression in Lungentumoren bekannt und mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Wiethage et al. 1994). Hinsichtlich der Ergebnisse, die von unserer Arbeitsgruppe bereits vorgestellt wurden, ist BMP-7 in Mamma- und Ösophaguskarzinomen ebenfalls durchweg in den Tumoren höher exprimiert nachweisbar (Schwalbe 2000, Clement et al. 1999).

Nr.	Aktin	BMP-1	BMP-4	BMP-7	erbB-2	erbB-4	EGFR
1	1-1	0-0	2-1	1-0	1-0	0-0	1-2
2	1-1	1-1	1-1	2-1	1-1	1-2	1-1
3	1-1	2-1	2-1	1-1	2-1	1-2	1-1
4	1-1	2-1	1-0	1-0	2-1	1-1	2-1
5	1-1	0-1	1-1	1-0	1-1	1-2	1-1
6	2-1	1-1	2-1	1-0	2-1	2-1	2-1
7	1-1	1-1	1-2	1-0	1-2	1-2	1-2
8	2-1	1-1	1-0	1-0	2-1	1-0	2-1
9	1-1	1-1	2-1	2-1	1-0	1-2	1-1
10	1-1	2-1	2-1	1-0	2-1	1-1	1-1
11	1-1	1-1	2-1	2-1	1-1	1-1	1-1
12	1-1	1-1	2-1	1-0	1-1	1-2	2-1
13	2-1	2-1	2-1	1-0	2-1	1-0	2-1
14	1-1	2-1	1-1	2-1	1-1	0-1	1-1

Tabelle 3.1: Visuelle Auswertung der ersten 14 Probenpaare.
Die Zahlen vor (für die Tumorprobe) und nach dem Bindestrich (für die Normalgewebeprobe) geben die visuelle Intensitätsausmessung wider.
"0" bedeutet, daß keine Bande zu erkennen war.
1-1: Intensität der Tumor-/Gewebeprobe gleich
2-1: Intensität in der Tumorprobe höher
1-2: Intensität in der Normalgewebeprobe höher

	β -Aktin	BMP-1	BMP-4	BMP-7	erbB-2	erbB-4	EGFR
Tumor > Normalgewebe	3	6	10	13	8	3	5
Tumor = Normalgewebe	11	7	3	1	5	3	7
Tumor < Normalgewebe	-	-	1	-	1	7	2
keine Banden nachweisbar	-	1	-	-	-	1	-
Anzahl der Probenpaare n=	14	14	14	14	14	14	14

Tabelle 3.2: Ergebnisse der visuellen Vergleiche zwischen Tumor-/Normalgewebe der Proben 1-14.

Ausgehend von der Beobachtung, daß sich die BMP-7-mRNA-Expression in 13 der 14 Fälle im Tumor als höher erwies, entschieden wir uns, BMP-7, der wegen seiner Funktion als Wachstums- und Differenzierungsfaktor (Kawabata et al. 1998) im Hinblick auf die Tumorgenese sehr interessant ist, bei weiteren Gewebepaaren zu untersuchen.

Der aus der erbB-Familie stammende EGFR wurde ebenfalls einer weiteren Untersuchung zugeführt (Tabelle 3.3). Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß eine regulatorische Beeinflussung beider Signalwege aufgezeigt werden könnte. Ein Zusammenhang dieser Art ist in Mammakarzinomzelllinien in bezug auf das zu BMP-7 nahe verwandte BMP-6 bereits nachgewiesen worden (Clement et al. 1999). EGFR-vermittelte Signaltransduktion greift dabei nicht nur in die Expression von BMPs ein, sondern unterbricht durch Phosphorylierung des SMAD-1 mittels Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) die

BMP-Signalkette (Kretschmar et al. 1997). Aus diesen Gründen konzentrierte sich unser weiteres Vorgehen auf BMP-7 und EGFR.

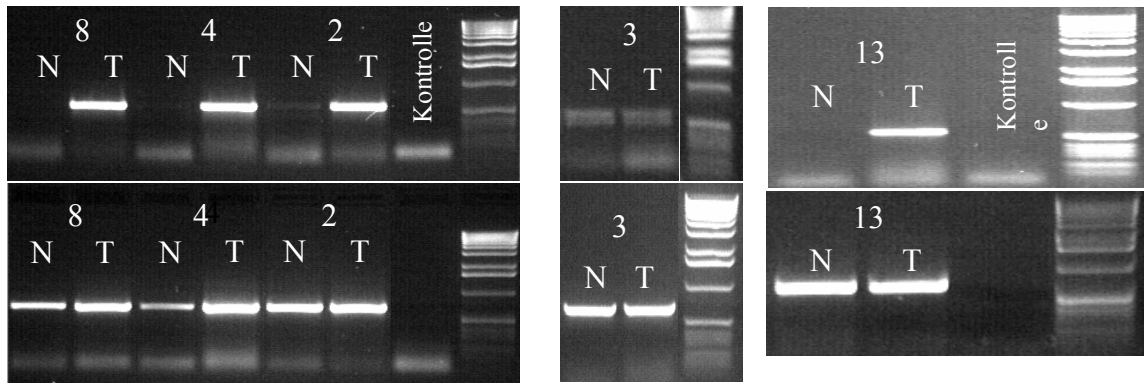
Nr.	Aktin	BMP-7	EGFR
1	1-1	1-0	1-2
2	1-1	2-1	1-1
3	1-1	1-1	1-1
4	1-1	1-0	2-1
5	1-1	1-0	1-1
6	2-1	1-0	2-1
7	1-1	1-0	1-2
8	2-1	1-0	2-1
9	1-1	1-0	1-1
10	1-1	1-0	1-1
11	1-1	2-1	1-1
12	1-1	1-0	2-1
13	2-1	1-0	2-1
14	1-1	2-1	1-1
15	2-1	2-1	1-1
16	2-1	1-1	1-1
17	2-1	2-1	1-1
18	1-1	2-1	1-1
19	1-2	2-1	1-1
20	2-1	2-1	1-1
21	1-1	1-0	2-1
22	2-1	1-0	2-1
23	1-1	2-1	1-1

Nr.	Aktin	BMP-7	EGFR
24	1-1	2-1	1-1
25	2-1	1-0	1-0
26	1-2	1-2	1-2
27	2-1	1-0	1-1
28	2-1	1-0	2-1
29	1-1	2-1	2-1
30	1-1	1-0	2-1
31	1-1	2-1	2-1
32	2-1	1-0	1-1
33	1-1	1-0	2-1
34	2-1	1-1	0-0
35	2-1	2-1	2-1
36	2-1	2-1	2-1
37	2-1	1-0	1-1
38	2-1	2-1	2-1
39	1-1	1-1	2-1
40	1-1	1-0	1-2
41	2-1	2-1	2-1
42	2-1	2-1	2-1
43	1-1	2-1	1-1
44	2-1	1-0	1-1
45	2-1	2-1	1-1
46	2-1	1-0	2-1

Tabelle 3.3: Visuelle Intensitätsvermessung der Tumoraare 1-46.
Die Bedeutung der Zahlenkombinationen entspricht derer in Tabelle 3.1.

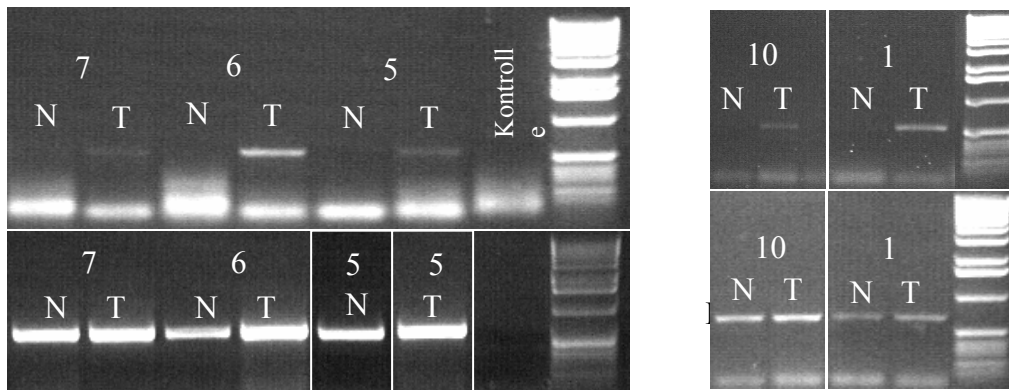
Im folgenden befinden sich die Aufnahmen der BMP-7-Gel-Banden mit dem zugehörigen Banden des β -Aktins aller Tumoraare 1-46 (Abbildungen 3.1a, 3.1b und 3.1c).

BMP-7



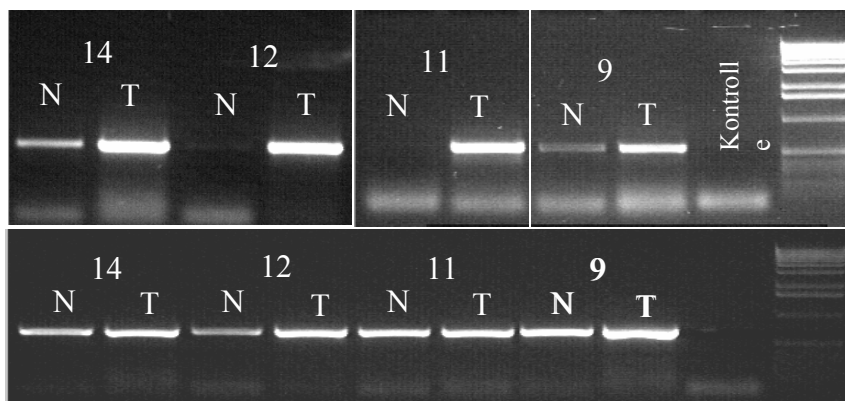
β-Aktin

BMP-7



β-Aktin

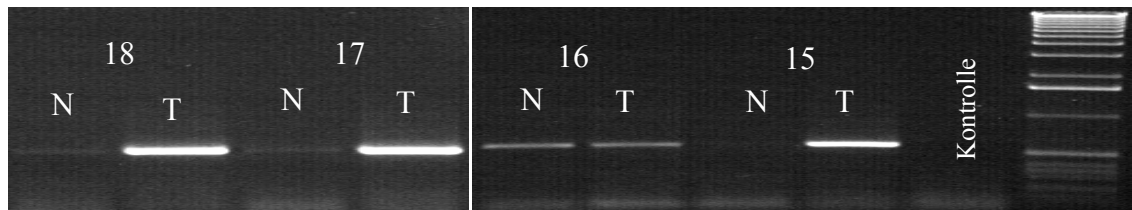
BMP-7



β-Aktin

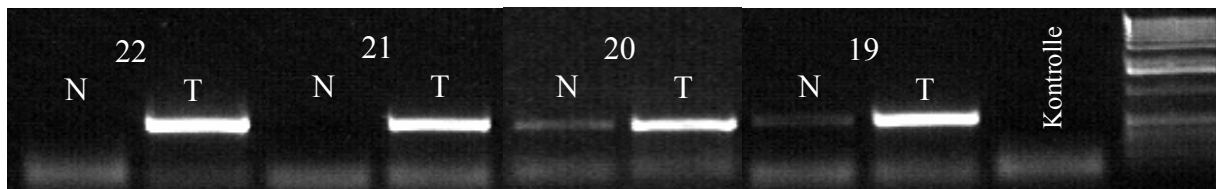
Abbildung 3.1a: Gelbanden der RT-PCR nach Inkubation mit BMP-7- und β-Aktin-Primern (T = Tumor, N = Normalgewebe, Zahlen = Probennummern)

BMP-



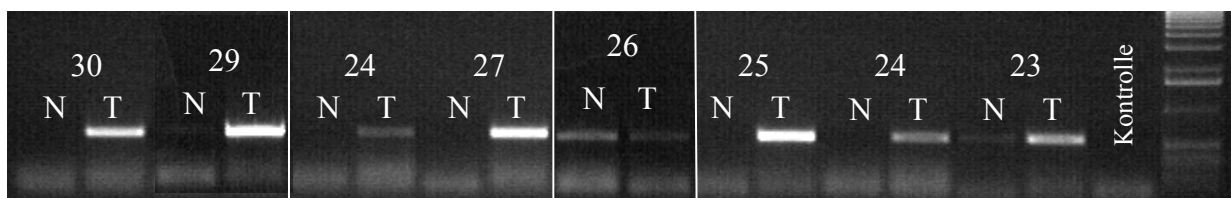
β -Aktin

BMP-



β -Aktin

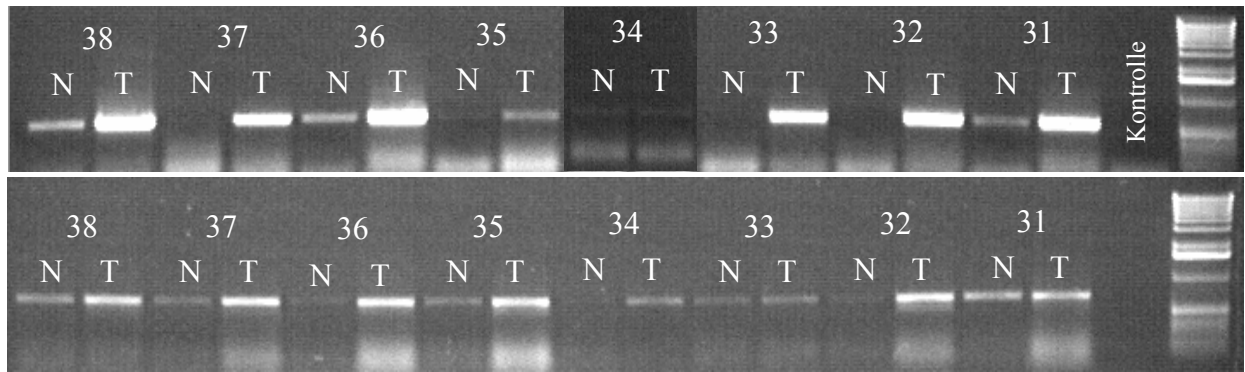
BMP-



β -Aktin

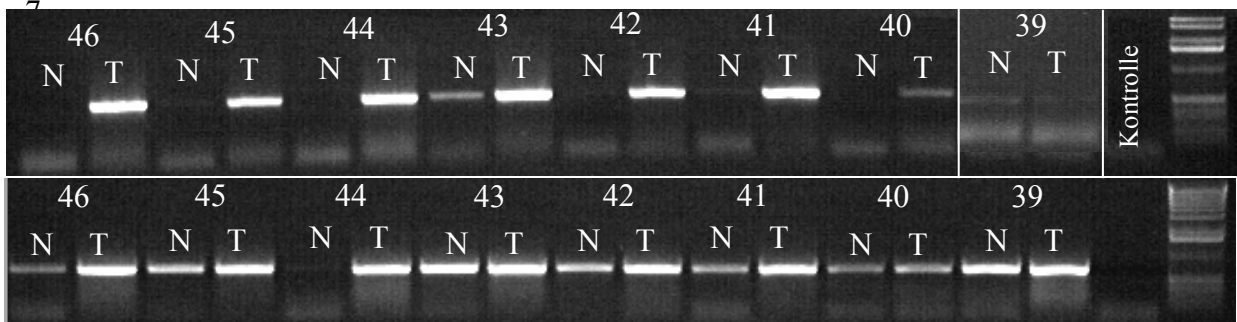
Abbildung 3.1b: Gelbanden der RT-PCR nach Inkubation mit BMP-7- und β -Aktin-Primern (T = Tumor, N = Normalgewebe, Zahlen = Probennummern)

BMP-7



β -Aktin

BMP-7



β -Aktin

Abbildung 3.1c: Gelbanden der RT-PCR nach Inkubation mit BMP-7- und β -Aktin-Primern (T = Tumor, N = Normalgewebe, Zahlen = Probennummern)

In Aufnahme 3.1a konnte zum Beispiel bei den Tumorkpaaren 9 und 11 sehr gut auf einen vermehrten BMP-7-mRNA-Gehalt der Tumorkprobe geschlossen werden, da sich die Intensitäten der β -Aktin-Banden beider Proben nur gering unterschieden. Bei der Betrachtung des Paares 19 (Abbildung 3.1b) fiel auf, daß sich die BMP-7-Bande des Tumors kräftiger als die Normalgewebebande darstellte, obwohl die β -Aktin-Bande des Tumors schwächer war. Dies bedeutet, daß trotz der geringeren mRNA-Menge die Tumorkprobe mehr BMP-7-mRNA enthielt als das korrespondierende Normalgewebe, aus der mehr mRNA extrahiert worden war.

Häufig zeigten die Tumoren jedoch eine kräftigere BMP-7-Bande zusammen mit einer ebenfalls intensiveren β -Aktin-Bande (zum Beispiel Gewebepaar 41, 42, 45 in der Abbildung 3.1c). In vielen Fällen war die BMP-7-Expression der Normalgewebe so gering, daß eine Bande visuell nicht erkennbar war (zum Beispiel Probenpaar Nr.8). Man konnte aber feststellen, daß sich die Bandenintensitäten Tumor versus Normalgewebe hinsichtlich des BMP-7 meist stärker unterschieden als die β -Aktin-Banden. Um diese Fälle genauer auswerten zu können, bestimmten wir Quotienten (siehe Seite 33), die es ermöglichten, die verschiedenen Intensitätsunterschiede hinsichtlich des BMP-7- Bandenpaares und des β -Aktin-Bandenpaares miteinander zu vergleichen.

Zusammenfassend zeigte die visuelle Auswertung folgende Ergebnisse für den Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe (Tabelle 3.4).

	β -Aktin	BMP-1	BMP-4	erbB-2	erB-4
Tumor > Normalgewebe	3	6	10	8	3
Tumor = Normalgewebe	11	7	3	5	3
Tumor < Normalgewebe	-	-	1	1	7
keine Bande nachweisbar	-	1	-	-	1
Anzahl der Probenpaare n=	14	14	14	14	14

	β -Aktin	BMP-7	EGFR
Tumor > Normalgewebe	22	41	20
Tumor = Normalgewebe	22	4	21
Tumor < Normalgewebe	2	1	4
keine Bande nachweisbar	-	-	1
Anzahl der Probenpaare n=	46	46	46

Tabelle 3.4a/b: Ergebnisse der visuellen Vergleiche zwischen Tumor-/Normalgewebe der Proben 1-46.

Dabei fiel - wie oben bereits erwähnt - besonders die BMP-7-mRNA-Expression auf, die in der Tumorkprobe bis auf einige Ausnahme (5/46) immer stärker als die Normalprobe war.

Die Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe hinsichtlich der EGFR-mRNA-Expression zeigten zu fast gleichen Anteilen eine vergleichbare (20/46) oder höhere (21/20) Expression zugunsten der Tumorprobe. 4 Normalgewebe hatten höhere EGFR-mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den korrespondierenden Tumorproben.

Der absolute Gehalt an mRNA der einzelnen Gewebeproben unterliegt jedoch Schwankungen. Der Zustand des Gewebes bei der Entnahme, der Gefriervorgang, die Kühlkette, die RNA-Extraktion sowie die cDNA-Synthese können die cDNA-Quantität, die schließlich in der PCR inkubiert wird, verändern.

Um diese Konzentrationsunterschiede zu berücksichtigen, wurden die Banden der BMP-7- und EGFR-Expression densitometrisch vermessen. War eine Bande so gering, daß sie unter die Nachweisgrenze des digitalen Systemes lag (Nachweis-Gruppe 2, zum Beispiel Normalgewebe des Probenpaaes Nr.24), so wurde ihr der Wert der schwächsten Bande der entsprechenden Kategorie zugewiesen (zum Beispiel aller BMP-7-Werte der Normalgewebe). Ebenso verfuhr man mit den Proben, in denen auch visuell keine Bande nachweisbar war (Nachweis-Gruppe 3, zum Beispiel Normalgewebe des Probenpaaes Nr.37). Dies betraf ausschließlich auf einige BMP-7 untersuchte Normalgewebeproben zu, die in der PCR eine äußerst schwache BMP-7-Expression zeigten (siehe Tabelle 3.3). Dieser Schritt war nötig, da im Zuge der Quotientenbildung nicht durch „Null“ dividiert werden konnte. Damit wurde jedem untersuchten Gewebeprobenpaar ein Wert zugewiesen.

Es war so anhand der ubiquitären mRNA-Expression des „House-keeping-Genes“ β -Aktin möglich, durch Quotientenbildung einen semiquantitativen Vergleich durchzuführen.

Die β -Aktin-Werte der Tumor- wurden durch die der Normalprobe dividiert. Damit besaß man einen Wert, der angab, in welchem Verhältnis der Gehalt an Gesamt-mRNA der Tumorprobe im Vergleich zur Normalprobe stand (siehe Tabelle A1 im Anhang). Dasselbe geschah mit den gemessenen Werten für BMP-7 (siehe Tabelle A2 im Anhang). Diese beiden Quotienten wurden wiederum durcheinander geteilt (BMP-7- durch den Aktinquotient). Man erhielt so den BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten, der ohne Abhängigkeit vom absoluten mRNA-Gehalt der Probe die Aussage zuließ, um wieviel mal mehr (bei Werten größer 1) oder weniger (bei Werten kleiner 1) BMP-7-mRNA in der Tumorprobe im Vergleich zur Normalprobe vorhanden war (siehe Tabelle A3 im Anhang). Mithilfe dieses Verfahren wurden auch der EGFR-Tumor/Normal-Quotient errechnet (siehe Tabellen A4 und A5 im Anhang).

Basierend auf dem BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten ergab sich die Feststellung, daß die BMP-7-Expression in 43 Fällen im Tumor höher (Quotient >1) als im Normalgewebe war.

Nur in zwei Fällen war BMP-7 im Tumor schwächer (Quotient <1) exprimiert. Diese Ergebnisse stimmten mit der visuellen Ausmessung sehr gut überein (siehe Tabelle 3.5 und Abbildung 3.2).

	BMP-7 visuell	Quotient		EGFR visuell	Quotient
Tumor > Normalgewebe	41	43		20	18
Tumor = Normalgewebe	4	1		22	1
Tumor < Normalgewebe	1	2		4	27
Anzahl der Probenpaare n=	46	46		46	46

Tabelle 3.5: Gegenüberstellung der Ergebnisse des visuellen Vergleiches und des Vergleiches anhand des Tumor/Normal-Quotienten für BMP-7 und EGFR

Im Gegensatz zu den Unterschieden des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten, die Werte bis zu 50 erreichten (Tumor-mRNA-Expression 50 mal höher als im Normalgewebe), unterschied sich die EGFR-Expression eher geringfügig (siehe Abbildungen 3.2 und 3.3). In zahlreichen Fällen (27/46) war die Tumorexpression leicht schwächer (Quotient <1) als im Normalgewebe. Einen EGFR-Tumor/Normal-Quotienten größer als 1 hatten 18 der 46 vermessenen Probenpaare zu verzeichnen. Beim Vergleich mit den Feststellungen des visuellen Vergleiches, fiel eine Diskrepanz auf, die besonders die Attribute „gleiche Expression“ und „kleinere Expression“ betraf (siehe Tabelle 3.5). Diese Verschiebung kam dadurch zustande, daß sich in vielen Probenpaaren ein leicht erhöhter β -Aktin-Bandenwert der Tumorprobe messen ließ, der, als Folge der Quotientenbildung, viele EGFR-Bandenpaare, die ähnliche Meßwerte aufwiesen, auf einen EGFR-Tumor/Normal-Quotienten unter 1 verringerten. Es zeigte sich so in den densitometrisch untersuchten Probenpaaren eine beträchtliche Anzahl (27/46), in denen die EGFR-mRNA-Expression im Tumor eher niedriger ausfiel als im korrespondierenden Normalgewebe. Um diesen Sachverhalt etwas zu verdeutlichen, wurden Schwellenwerte willkürlich festgelegt mit den Grenzen von 2 und 0,5. Alle Probenpaare, die mit ihrem Quotienten in den Bereich zwischen diesen Schwellenwerten fielen (0,5 – 2), unterschieden sich entweder in ihrer Expression in der Tumorprobe weniger als das Doppelte oder mehr als die Hälfte im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. Innerhalb dieser Grenzen befanden sich 25 der Probenpaare, die anhand ihrer EGFR-Tumor/Normal-Quotienten ausgewertet wurden, während das nur für 8 der BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten zutraf. Man kann so schlußfolgern, daß sich die Unterschiede der EGFR-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe in einem Bereich befinden, in dem

die Unterschiede nicht so groß sind. Daher sollte man bei der Untersuchung der EGFR-mRNA-Expression eher die Quotienten-Methode zur Auswertung heranziehen, da die nur leichten Unterschiede in der Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe sonst durch Veränderungen der Menge der aus den Tumoren extrahierten mRNA leichter verfälscht werden können.

Bei der Betrachtung der BMP-7-Ergebnisse in Tabelle 3.5 könnte man aufgrund der relativ guten Übereinstimmung annehmen, beide Auswertungsverfahren die fast gleichen Ergebnisse ergäben. Diese Konstellation beruhte vor allem auf der starken Expression der BMP-7-mRNA in den Tumoren, die zur Folge hatte, daß kleine Unterschiede in der Menge der eingesetzten Gesamt-mRNA das Ergebnis nicht grundlegend veränderten. Dennoch hatte die densitometrische Methode den Vorteil, eben diese Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten Menge und der Änderungen aufgrund von Störeinflüssen durch die Quotientenbildung zu verringern.

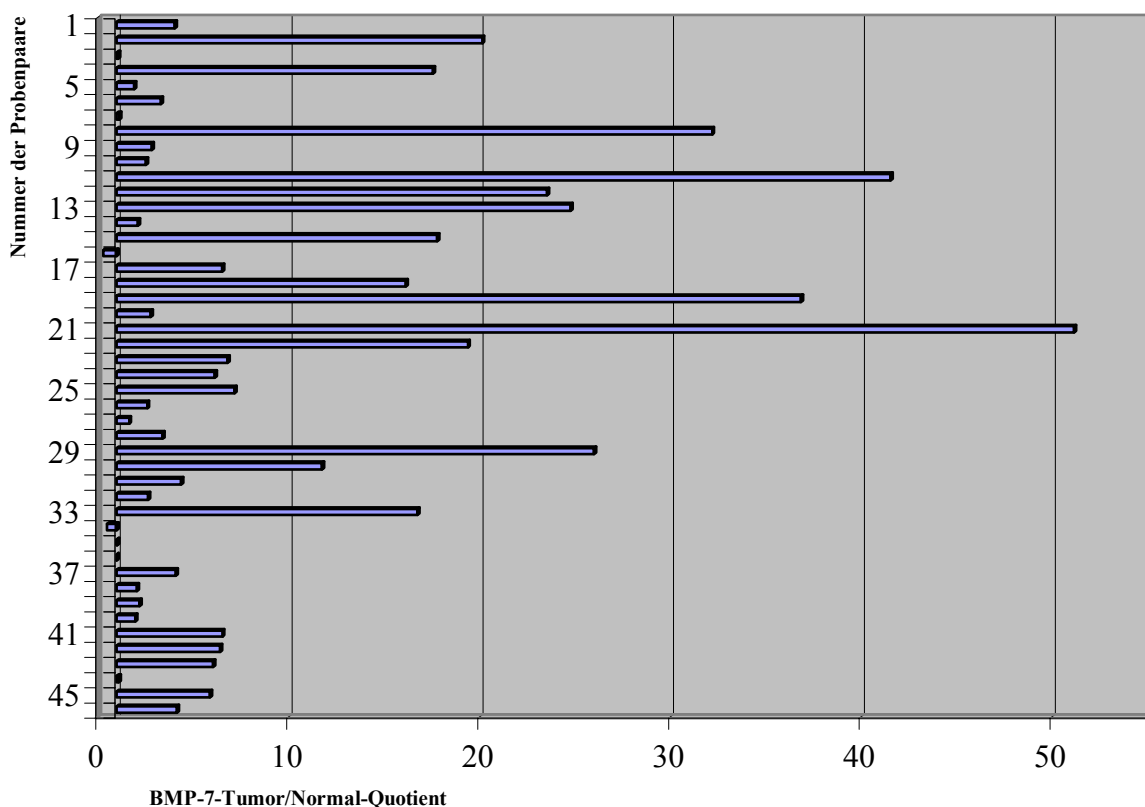


Abbildung 3.2: Vergleiche der Bandenintensitäten zwischen Tumor- und Normalgewebeprobe bei Untersuchung auf BMP-7-mRNA-Expression anhand des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten

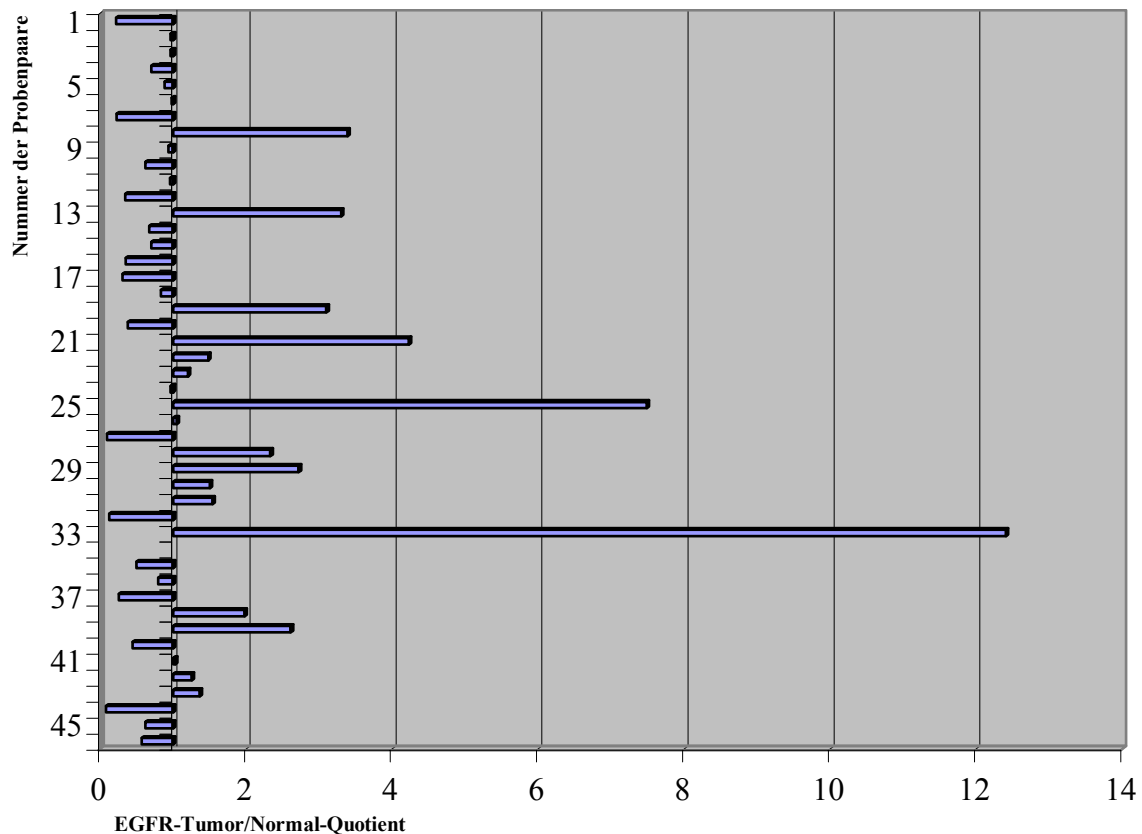


Abbildung 3.3: Vergleiche der Bandenintensitäten zwischen Tumor- und Normalgewebeprobe bei Untersuchung auf EGFR-mRNA anhand des EGFR-Tumor/Normal-Quotienten

Für die weitere statistische Analyse wurden die Ergebnisse der Tumor/Normal-Quotienten herangezogen, da diese einen quantitativen Vergleich zwischen den Tumor- und Normalgewebeprobe verschiedener Patienten zuließen. Unser Augenmerk galt besonders den Korrelationen mit den klinischen Parametern der untersuchten Tumoren (siehe Abschnitt 3.3).

Als Résumé der Untersuchungen auf mRNA-Ebene läßt sich festhalten, daß es differenzierte Expressionen der untersuchten Faktoren in Tumor- und Normalgewebe gibt und daß – mit Ausnahme des erbB-4 - die Faktoren tendenziell in den Tumoren einer höheren Expressionsrate folgen.

Ob sich diese Beobachtungen auch auf der Proteinebene nachvollziehen ließen, sollte bei der immunhistologischen Untersuchungsreihe geprüft werden.

3.2 Untersuchungen auf Proteinebene

Paraffinschnitte der 46 untersuchten Tumore wurden daraufhin immunhistologisch auf die Proteine EGFR, ERBB-2, ERBB-4 und BMP-7 gefärbt. Zunächst wurden 11 Tumoren untersucht, um eine Abschätzung der Relevanz der Proteine vorzunehmen (Tabelle 3.6).

Nr.	EGFR		ERBB2		ERBB4		BMP-7	
	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal
2	2	0	2	0	2	2	4	0
3	0	0	0	0	3	0	3	0
4	0	0	2	2	3	3	2	0
5	0	0	2	2	2	2	3,5	0
7	0	0	2	2	2	2	1	0
8	0	0	2	0	2	2	3	0
9	1	0	2	0	2	3	2	0
11	0	0	2	2	2	2	4	0
12	0	0	3	3	2	2	2	0
13	0	0	1	1	2	3	2	0
14	0	0	1	1	0	0	1	0

Tabelle 3.6: Semiquantitative Ausmessung verschiedener immunhistologischen Inkubationen. Skala von „0“ (keine Immunreaktion) bis „5“ (sehr starke Immunreaktivität)

BMP-7 war in allen 11 Tumoren nachweisbar. Bei EGFR nur in zwei der Tumorproben. Das normale Lungengewebe war bei beiden Antikörpern immer negativ. ERBB2- und ERBB4-Proteine waren fast in allen Normal- und Tumoranteilen nachweisbar.

Dabei ist die Antikörper-Antigen-Bindung, die die Detektion der einzelnen Proteine ermöglichte, als hochspezifisch einzuschätzen. Unspezifische Immunreaktionen wurden durch eine Kontrollserie, die aus schon als positiv bewerteten Schnitten bestand, nach Inkubation mit einem 1:1000 hochverdünnten Antikörper ausgeschlossen, da sich in dieser Serie bei keinem der Präparate eine Immunreaktion zeigte.

Daraufhin sollte bei BMP-7, bei dem sich ein auffälliger Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigte, verifiziert werden, welche quantitativen Veränderungen auf Proteinebene bestehen und inwieweit sich diese mit den Ergebnissen der PCR-Inkubationen decken, um eventuell von der einen auf die andere Ebene Rückschlüsse ziehen zu können. Es wurden 35 weitere Tumorgewebeschnitte der immunhistologischen Untersuchung zugeführt.

Dabei konnte festgestellt werden, daß BMP-7-Proteine in 45 von 46 Tumoren in unterschiedlicher Qualität nachweisbar waren, während sich das normale Lungengewebe durchweg als negativ (46/46) herausstellte (Tabelle 3.7). Dabei begründete sich das negative Ergebnis der Tumorprobe Nr. 01 auf der Feststellung, daß der Tumoranteil des

Gewebeschnitts fast ausschließlich aus nekrotischem Material bestand, wodurch keine Zellproteine mehr nachweisbar waren. Damit deckten sich die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung gut mit den Feststellungen, die mithilfe der PCR möglich waren. Auch hier war BMP-7-mRNA in allen Tumorproben nachweisbar, und es zeigte sich in 43 von 46 Fällen (mittels BMP-7-Tumor/Normal-Quotient) eine erhöhte BMP-7-mRNA-Expression in den Tumorgewebeproben (siehe Tabelle 3.5).

Um eine semiquantitative Beurteilung der Proteinmengen vorzunehmen, wurden die Färbeintensitäten mit dem OPTIMAS-System vermessen. Die Prozentzahlen (BMP-7-Immunreaktion BMP-7-IR) entsprachen dem computertechnisch errechneten Anteil der bräunlich gefärbten Flächen, die immunhistologische Aktivität anzeigten, an der Fläche des Gewebeschnittes. Umso höher diese prozentuale Angabe ausfiel, umso mehr Bindungen konnte der Antikörper auf dem entsprechenden Gewebeschnitt eingehen.

Nr.	BMP-7-IR				
1	0,5 %	21	3,16 %	35	1,2 %
2	12,05 %	22	40,8 %	36	2,5 %
3	10,5 %	23	16,7 %	37	3,82 %
4	2,8 %	24	8,46 %	38	32,6 %
5	22 %	25	31,2 %	39	64 %
6	12,2 %	26	7,6 %	40	5,3 %
7	2,2 %	27	11,8 %	41	37 %
8	8,2 %	28	43,2 %	42	7,9 %
9	4,34 %	29	1,01 %	43	4,72 %
10	3,3 %	30	8,1 %	44	33,2 %
11	29,45 %	31	45 %	45	29,6 %
12	6,58 %	32	21,1 %	46	36,8 %
13	20,3 %	33	1,58 %		
14	1,16 %	34	47,5 %		

Tabelle 3.7: Quantitative Ausmessung der BMP-7-IR mit dem OPTIMAS-System. Die Prozentzahlen entsprechen dem Flächenanteil der immunhistologisch gefärbten Areale.

In Abbildung 3.4a-f befinden sich repräsentative Photographien der gefärbten Gewebeschnitte mit Angabe des inkubierten Antikörper. Diese mikroskopischen Gewebeschnitte setzten sich aus dem Tumor, der an seinem dichten Zellverband, welcher eine erhöhte Zell-Zellplasma-Relation und Kernpolymorphismen aufwies, zu erkennen war, und dem dazwischen liegenden Bindegewebe zusammen. Darüber hinaus befand sich an den Rändern der Präparate Restanteile gesunden Lungengewebes, welches auf den Abbildungen nicht dargestellt wurde.

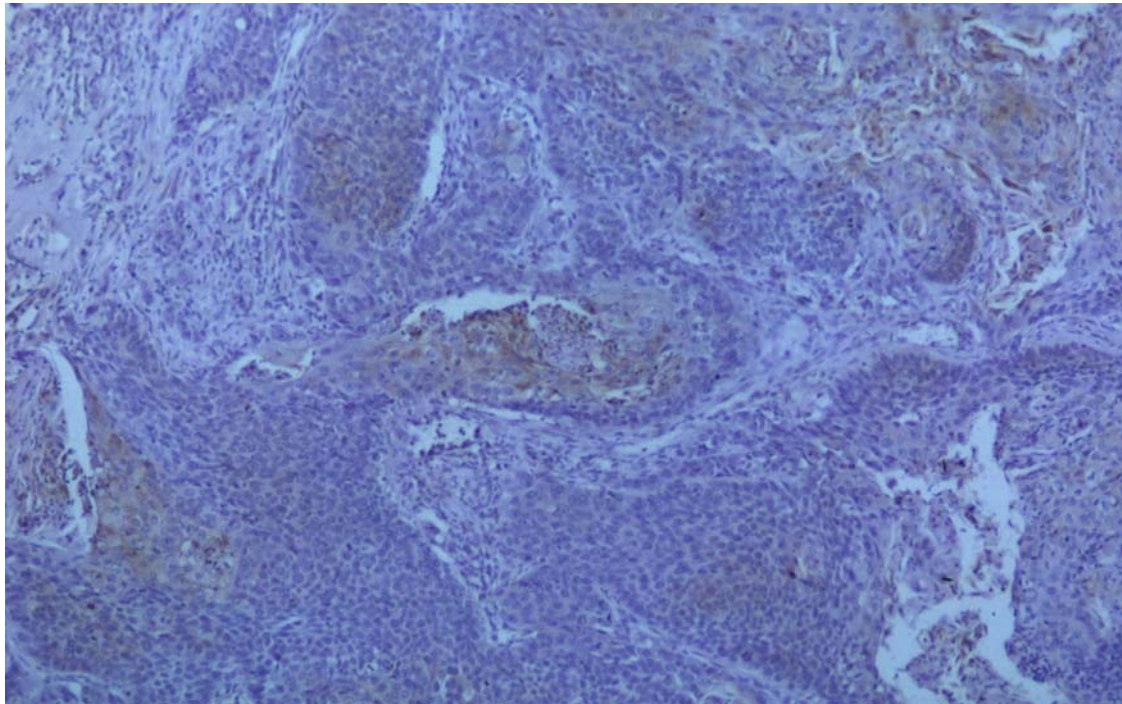


Abbildung 3.4a: Immunhistologische Färbung nach Inkubation mit BMP-7-Antikörpern. Probe Nr. 02. Histologischer Grad 1. Vergrößerung 1:250.

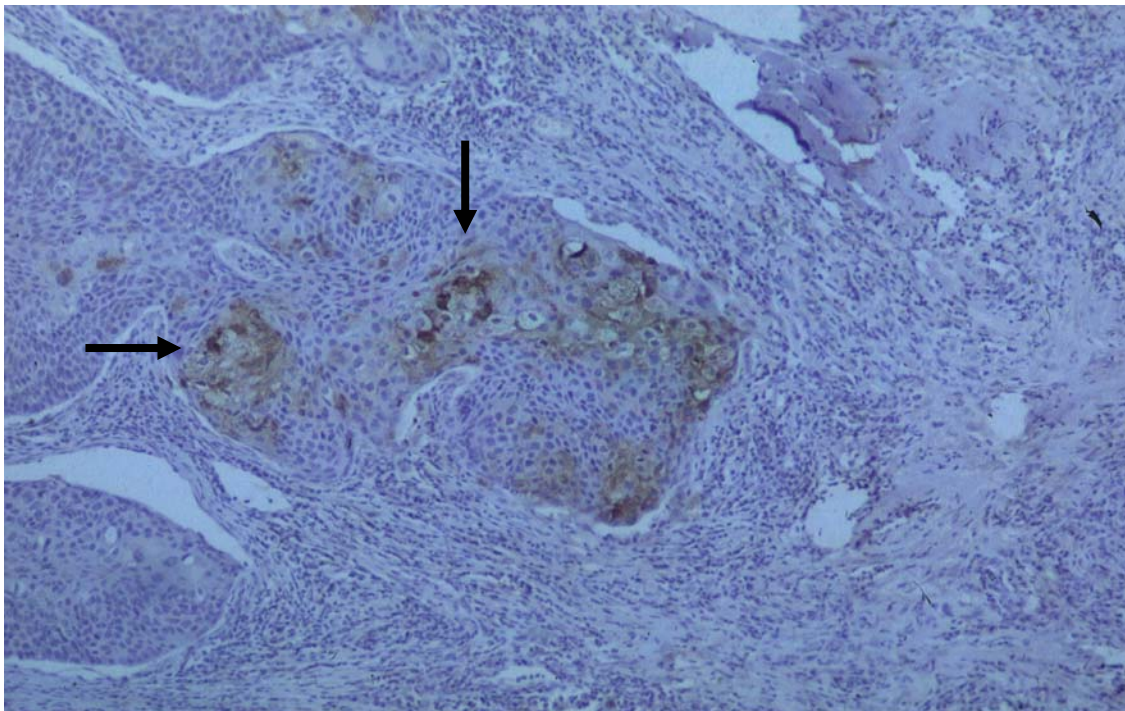


Abbildung 3.4b: Immunhistologische Färbung nach Inkubation mit BMP-7-Antikörpern. Probe Nr. 02. Histologischer Grad 1. Vergrößerung 1:250. Pfeile siehe Text.

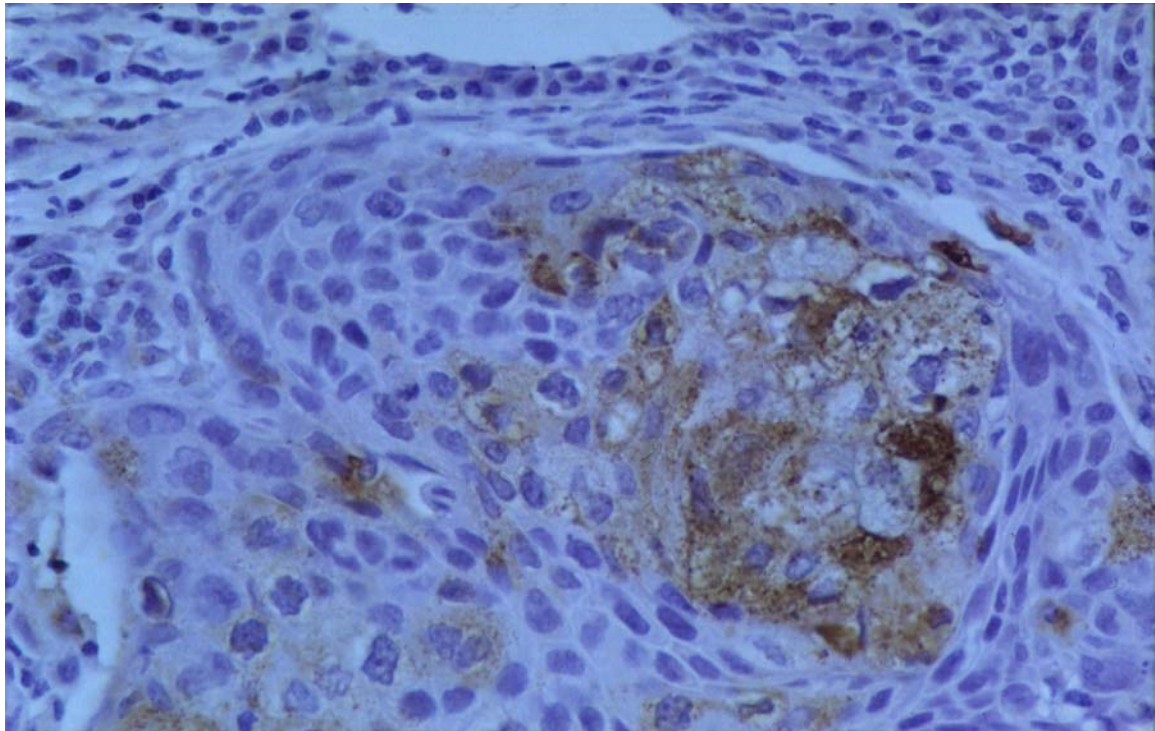


Abbildung 3.4c: Immunhistologische Färbung nach Inkubation mit BMP-7-Antikörpern. Probe Nr. 11. Histologischer Grad 2. Vergrößerung 1:1000.

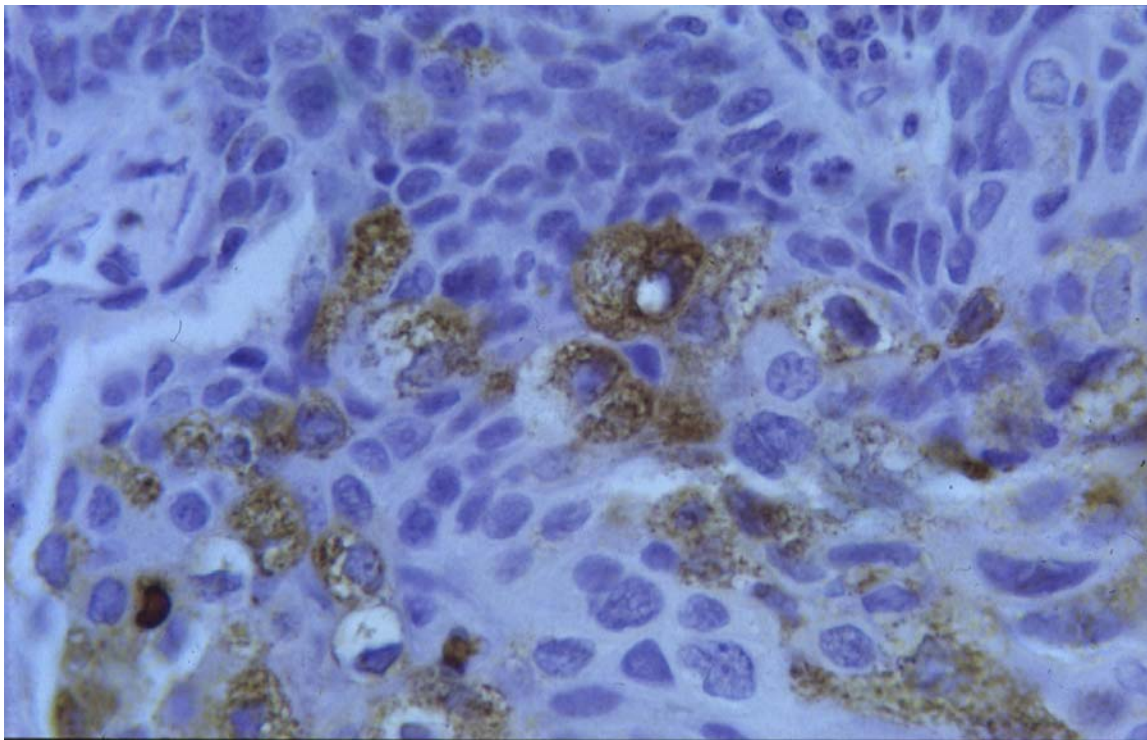


Abbildung 3.4d: Immunhistologische Färbung nach Inkubation mit BMP-7-Antikörpern. Probe Nr. 11. Histologischer Grad 2. Vergrößerung 1:1500.

Man erkannte sehr gut die bräunlich gefärbten Areale, die den Bereichen der erfolgten Bindung der hochspezifischen Antikörper entsprachen. Areale, in denen die BMP-7-spezifische Immunreaktivität hoch war, gehörten häufig zu den Zonen des Tumors, die aufgrund ihrer Zellmorphologie einen verhornenden Aspekt darlegten (siehe Pfeile in Abbildung 3.4b). Dabei befanden sich die gefärbten Zonen im Bereich der Zellmembran und des Zellplasmas.

Bei der Begutachtung genau hintereinander gelegener Paraffinschnitte der Tumorprobe Nr.2, die mit BMP-7- bzw. EGFR-Antikörpern inkubiert wurden, fiel auf, daß BMP-7 in anderen Regionen des Tumorareals nachweisbar war als EGFR (Abbildung 3.5a-b). Diese Feststellung könnte auf eine regulatorische Verbindung zwischen BMP-7 und dem EGFR schließen lassen. Interaktionen dieser beiden Faktorengruppen konnten zum Beispiel bei BMP-2 und BMP-6 in anderen Tumoren bereits nachgewiesen wurde (Kretzschmar et al. 1997, Clement et al. 1999). BMP-6 gehört in die gleiche BMP-Untergruppe wie BMP-7 und weist eine hohe Verwandtschaft auf (Kawabata et al. 1998, Tata et al. 1995). In von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten konnte jedoch keine Veränderung der BMP-7-mRNA-Konzentration bei Zugabe von EGF-Protein, dem Liganden des EGFR, auf Mammakarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr.Clement). Bisher liegen keine Daten zu einer möglichen Abhängigkeit der EGFR-Expression und BMP-7 vor.

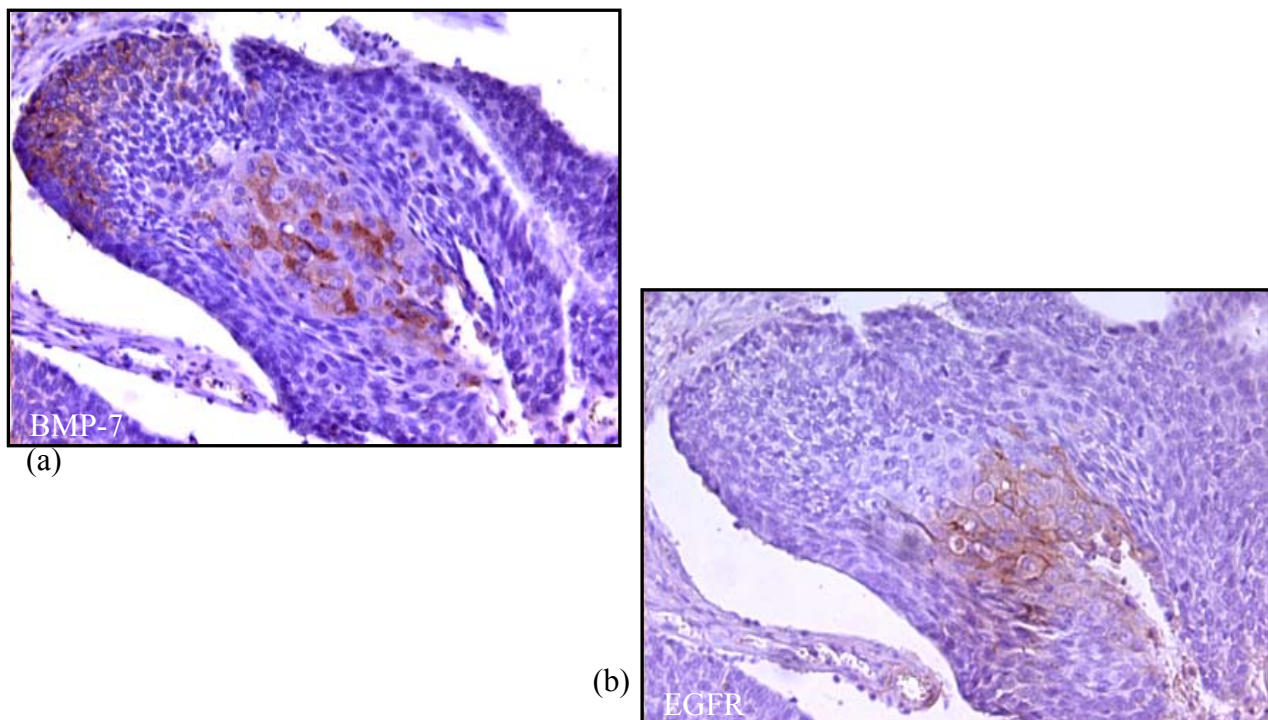


Abbildung 3.5: Aufeinanderfolgende immunhistologische Schnitte desselben Tumors. Inkubation mit (a) BMP-7-Antikörper und (b) EGFR-Antikörper

In Abbildung 3.5a fand sich die Immunreaktivität des BMP-7-Antikörpers in zwei Gebieten links oben und in der Mitte. Betrachtete man den Paraffinschnitt in Abbildung 3.5b (EGFR-Antikörperinkubation), so fiel auf, daß sich ein Gebiet in der Mitte bis leicht unten rechts bräunlich zeigte. Dabei schien die Färbung im zweiten Abschnitt zum großen Teil andere Zellen zu betreffen als im Gewebeschnitt der Abbildung 3.5a. Diese Feststellung könnte ein Hinweis darauf sein, daß eine regulatorische Verbindung beider Faktoren in Plattenepithelkarzinomen der Lunge existieren könnte.

3.2 Statistische Auswertung

Es wurde eine statistische Auswertung aller oben aufgezeigten Ergebnisse untereinander sowie mit allen zur Verfügung stehenden klinischen, histopathologischen Daten durchgeführt. Korrelationen wurden unter Zuhilfenahme des Statistik-Programmes SPSS (Version 10) errechnet.

Da die statistische Analyse der EGFR-mRNA-Expression keine Korrelation mit klinischen Parametern ergab, beziehen sich die nachfolgenden Punkte 3.3.1 bis 3.3.3 auf BMP-7.

3.2.1 Histologisches Grading

Eine besonders auffällige Konstellation zeigte sich beim Betrachten des histologischen Gradings in Abhängigkeit des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten (Abbildung 3.6 / 3.7). Mit steigender Differenzierung des Tumors stieg der BMP-7-Gehalt der Tumorprobe im Vergleich zum Normalgewebe tendenziell an.

Probenpaare mit einem BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten über fünf, welcher bedeutete, daß die BMP-7-mRNA-Expression im Tumor 5mal höher gemessen wurde als im Normalgewebe, gehörten ausschließlich den Tumoren vom Grad 1 oder 2 an (22/46). Bei Tumoren vom Grad 3 und 4 war die BMP-7-mRNA-Expression dagegen nur leicht gegenüber dem Normalgewebe erhöht (8/10). Niedriger als im Normalgewebe zeigte sich die Tumor-BMP-7-Expression zweier G3-Tumoren (2/10).

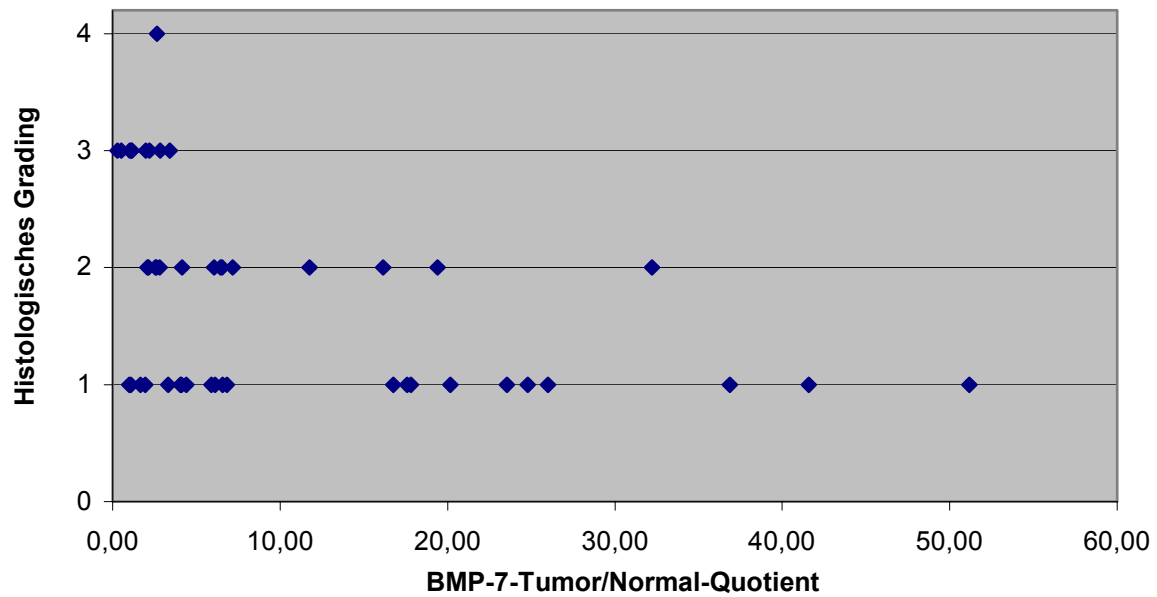


Abbildung 3.6: Histologisches Grading in Abhängigkeit des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten. Mit ansteigendem histologischen Grad sinkt die BMP-7-Expression im Vergleich zum Normalgewebe tendenziell ab.

Bei der statistischen Auswertung anhand des Mann-Whitney-Testes stellten sich die Unterschiede in der BMP-7-Verteilung zwischen Grad 2 und 3 sowie zwischen Grad 1 und 3 als signifikant heraus ($p < 0,001$).

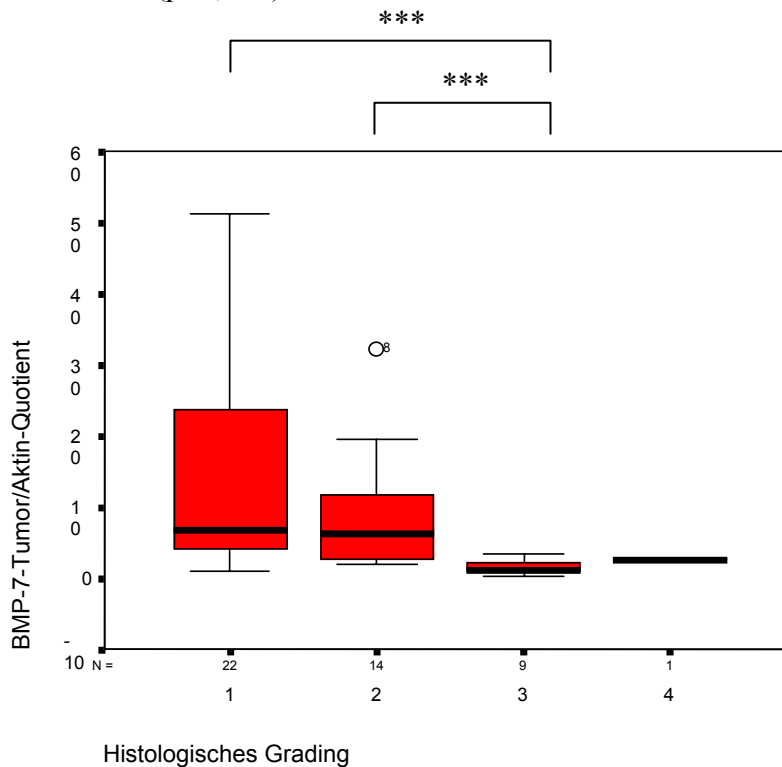


Abbildung 3.7: Boxplot des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten, eingeteilt in 4 Gruppen, die den histologischen Gradeinteilungen 1 bis 4 entsprechen (SPSS Version 10).

Auf Proteinebene zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zwischen Stärke der Immunreaktivität (BMP-7-IR) und dem histologischen Grading.

3.3.2 Verhornung

Bei einer Gegenüberstellung des BMP-7-Expression mit der Verhornung, bei der BMP-7 eine Rolle spielt (Drozdoeff et al. 1994), waren höhere BMP-7-Tumor/Normal-Werte bei teil-verhornenden oder verhornenden Tumoren zu finden (Abbildung 3.8 und 3.9). Zwischen den beiden Gruppen der verhornenden und nicht-verhornenden Tumoren war der Unterschied signifikant ($p < 0,044$; Mann-Whitney-Test).

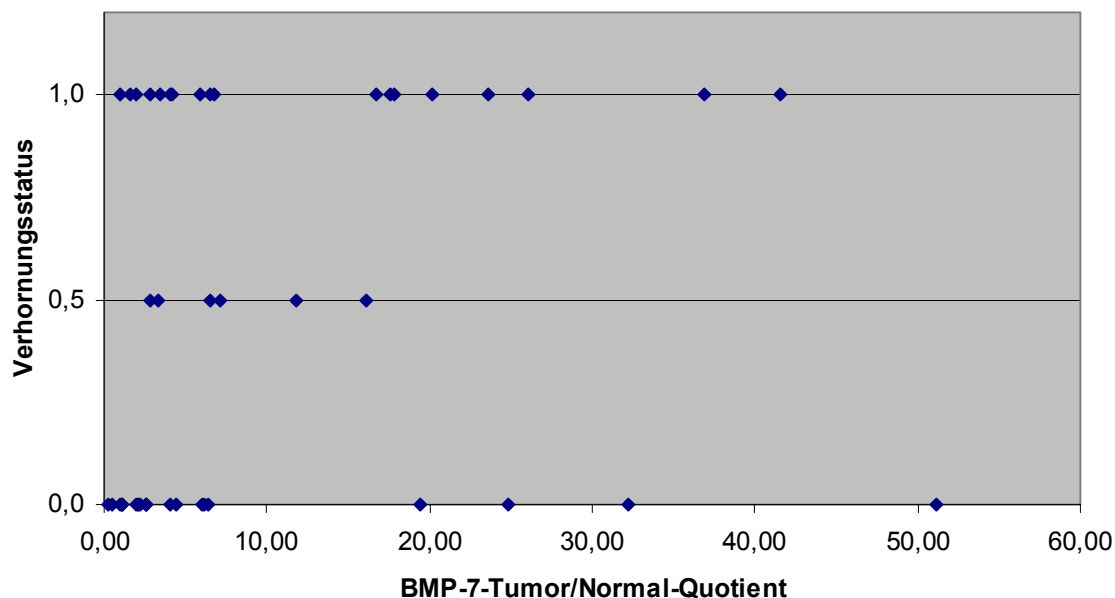


Abbildung 3.8: Verhornungsstatus in Anhängigkeit des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten

“1” = verhornend

“0,5” = teil-verhornend

“0” = nicht verhornend

Auf Proteinebene ließ sich kein statistischer Zusammenhang zwischen Stärke der Immunreaktivität (BMP-7-IR) und der Verhornungsaktivität aufdecken.

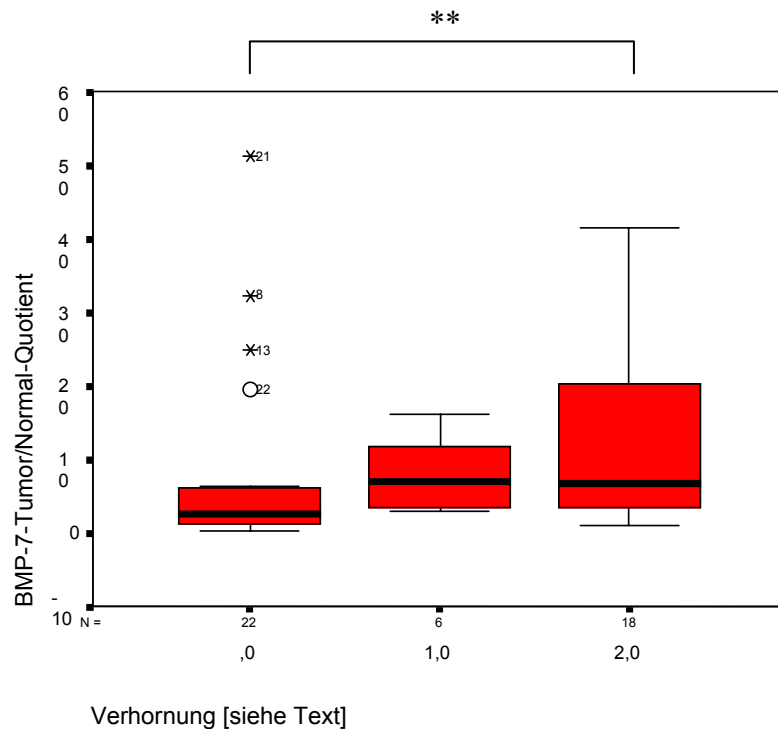


Abbildung 3.9: Boxplot des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten, eingeteilt in 3 Gruppen, die der Einteilung in nicht-verhornend („0“), teil-verhornend („1,0“) und verhornend („2,0“) entsprechen (SPSS Version 10).

3.3.3 Nodalstatus

Beim postoperativen Nodalstatus stellte sich der Anteil an hochgradigen Lymphknotenmetastasen um so geringer dar, desto höher der BMP-7-Tumor/Normal-Quotient ausfiel. Ab dem BMP-7-Tumor/Normal-Wert „5“ wurden 11 als N0 und 10 als N1 eingestuft. Der N2-Status kam ein Mal vor (Abbildung 3.10). Dies ließ sich jedoch nicht mit einer Signifikanz untermauern ($p > 0,05$, siehe Abbildung 3.11).

Auch auf Proteinebene zeigte sich keine Korrelation zwischen Stärke der Immunreaktivität (BMP-7-IR) und dem postoperativen Nodalstatus.

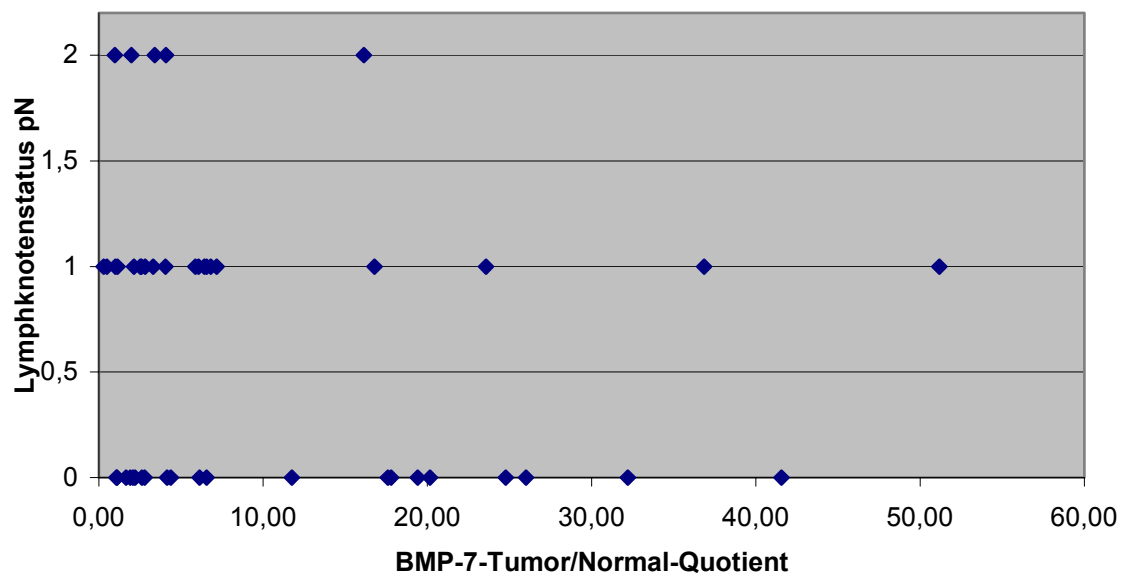


Abbildung 3.10: postoperativer Nodalstatus in Anhängigkeit des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten
 “0” = pN0 “1” = pN1 “2” = pN2

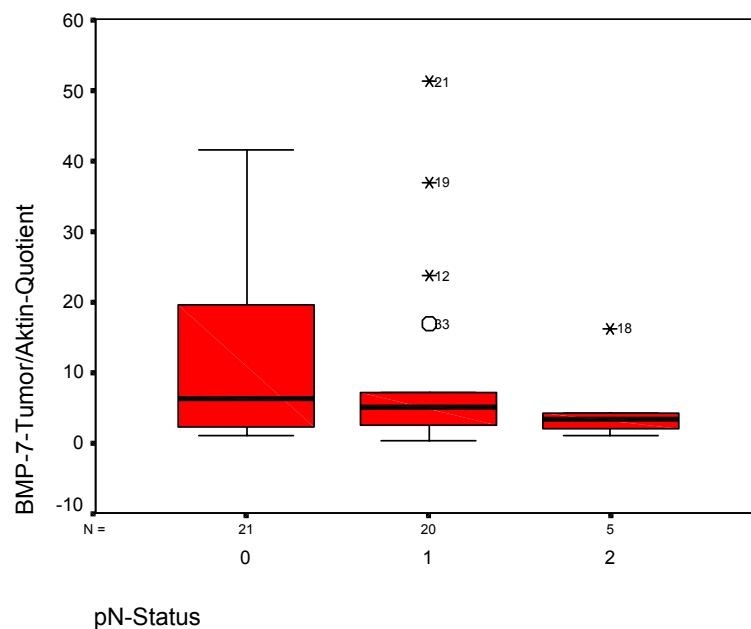


Abbildung 3.11: Boxplot des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten, eingeteilt in 3 Gruppen, die der klinischen Einteilung des postoperativem Lymphknotenstatus (pN) entsprechen (SPSS Version 10).

Weiterhin wurde der Tumorstatus (pT) und die Größe des Tumors untersucht, wobei jedoch keine Korrelationen auf mRNA und Proteinebene festgestellt werden konnten.

3.3.4 Verbindung zwischen BMP-7 und EGFR

Diese Korrelationsanalyse führten wir deshalb durch, da es sich – wie oben bereits erwähnt wurde - um eine sehr interessante Fragestellung handelt, ob zwischen den beiden Faktoren eine regulatorische Verbindung bestehen könnte. In den von uns untersuchten Plattenepithelkarzinomen zeigte sich keine signifikante Übereinstimmung zwischen der BMP-7- und EGFR-mRNA-Expression. Die mRNA-Expression von BMP-7 und EGFR könnte jedoch in verschiedene Arealen des Tumors liegen, und, da wir bei unseren Untersuchungen die mRNA aller lysierten Zellen einer makroskopischen Tumorgewebeprobe analysierten, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, aus welchem Anteil des Tumors die Zellen extrahiert worden waren. Zur weiteren Klärung müßten immunhistologisch ausgewählte Tumorzellen mittels Mikrodissektion aus dem Gewebeverband isoliert und dann gezielt auf ihre BMP-7- bzw. EGFR-mRNA-Expression untersucht werden.

Als wichtigstes Ergebnis konnten wir mit unseren Untersuchungen zeigen, daß BMP-7-mRNA in allen Plattenepithelkarzinomen der Lunge nachweisbar war und daß sie in den meisten Fällen im Tumor höher exprimiert wird als im korrespondierenden Normalgewebe. Auf Proteinebene zeigte sich das gleiche Bild. Die BMP-7-mRNA-Expression korrelierte darüber hinaus mit klinischen Parametern wie histologischem Grading hochsignifikant ($p < 0,001$), Verhornung signifikant ($p < 0,01$) und Nodalstatus ($p > 0,05$).

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren in Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit RT-PCR und Immunhistochemie analysiert.

Im Verlauf ihrer Entartung entfernen sich die Tumorzellen immer mehr von den Funktionen einer normalen Gewebezelle. Diese Veränderungen haben immer einen molekularen Hintergrund.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen konzentrierten sich unsere Bemühungen auf eine Gruppe von Proteinen, die im besonderen wachstumsmodulierende Aufgaben innehat (Kingsley 1994): die TGF β -Wachstumsfaktoren. Im Laufe der Tumorgenese nimmt die Spezialisierung der Zelle immer weiter ab. Diese tumoröse Regression oder Entartung stellt einen Rückschritt der Zellentwicklung in ein Stadium dar, das den Stadien der Embryogenese sehr ähnlich ist. Die Tumorgenese ist sozusagen eine Umkehr der Embryogenese. Unser Ziel war es, die Rolle einiger der TGF β -Wachstumsfaktoren und deren Expressionsverhalten auf molekularer Ebene zu beleuchten.

BMP-Faktoren lassen sich in verschiedene Untergruppen einteilen (Hogan 1996). Mit dem BMP-7, dem wir besondere Beachtung schenken und auf den wir später genauer eingehen werden (siehe Seite 5), hatten wir einen Vertreter der Gruppe BMP-5/6/7/8 untersucht. Um auch einen Einblick in die zweite Gruppe zu erhalten (BMP-2/4), wurde der Faktor BMP-4 in einem Untersuchungskollektiv von 14 Patienten auf mRNA-Ebene erforscht. Die BMP-4-Expression war in den meisten Fällen im Tumor stärker exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe.

BMP-1, eine Prokollagen C-Proteinase (Kessler et al. 1996), die nicht zur TGF β -Familie gehört, stellte sich als ca. jeweils zur Hälfte gleich oder höher exprimiert dar. BMP-1 ist Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt und besitzt eine wichtige Rolle in der Wundheilung und in der Gewebeausbildung verschiedener Organe während der Embryogenese (Kessler et al. 1996). Es war daher nicht überraschend, daß die BMP-1-mRNA-Expression in Tumoren, deren Wachstum gegenüber dem Normalgewebe beschleunigt ist, erhöht nachweisbar war. Pleomorphe Adenokarzinome zeigten in 67% der Fälle eine verstärkte BMP-1-mRNA-Expression (Kusafuka et al. 1998). In Mamma- und Ösophaguskarzinomzelllinien konnte ebenfalls eine erhöhte BMP-1-mRNA-Expression gefunden werden (Schwalbe 2000). Die Wirkung des BMP-1 fußt unter anderem in einer Aktivierung anderer BMP-Faktoren (Kessler et al. 1996).

Auch in der erbB-Gruppe, die klassische Wachstumsfaktorrezeptoren umfaßt (Dickson und Lippman 1995), wurden Faktoren auf ihre mRNA-Expression überprüft. Bei erbB-2 zeigte sich in über der Hälfte der Fälle eine erhöhte, bei erbB-4 eine geringere mRNA-Expression der Tumorprobe. Die ErbB-2-mRNA-Überexpression ist bereits in Adenokarzinomen der Lunge nachgewiesen worden (Kern et al. 1988). Diese hatte eine ungünstige Auswirkung auf die Prognose. Immunhistologisch zeigte sich bei erbB-2 und erbB-4 in den meisten Fällen ein ähnlicher Proteingehalt im Tumor- und Normalgewebe (siehe Tabelle 3.7).

Etwas ausführlicher befaßten wir uns mit dem EGFR (erbB-1), da Verbindungen im Signaltransduktionsweg von EGFR und BMPs seit längerem bekannt sind (Kretschmar et al. 1997, Ghosh Choudhury et al. 1999), wobei die Frage, welcher der beiden Signalwege die dominierende Rolle spielt, widersprüchlich beantwortet wird. EGFR-vermittelte Signaltransduktion greift dabei nicht nur in die Expression von Vertretern der BMPs ein, sondern interagiert auch mit BMP-induzierten Signalwegen. So ist das BMP-spezifische intrazelluläre Signalübertragungsmolekül SMAD-1 auch ein Angriffspunkt für die EGFR-vermittelte Signaltransduktion. SMAD-1 wird, nach Aktivierung des EGFR, durch Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) phosphoryliert und damit am Eintritt in den Zellkern gehindert – die BMP-Signalkette ist unterbrochen (Kretschmar et al. 1997). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits Interaktionen zwischen EGFR und BMP-6 aufdecken (Clement et al. 1999). Zugabe von EGF zu Mammakarzinomzelllinien erhöhte dosisabhängig die mRNA-Expression von BMP-6. Bei einem ähnlichen Experiment konnte jedoch unter Zugabe des EGF keine Veränderung der BMP-7-mRNA-Expression beobachtet werden (persönliche Mitteilung Dr.Clement). EGFR ist in Lungenkarzinomen bereits als prognostischer Faktor bekannt (Wiethage et al. 1994). Eine Überexpression ist dabei mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet.

Alle 46 untersuchten Probenpaare wurden mittels RT-PCR auf EGFR-mRNA-Expression untersucht. Die Unterschiede hinsichtlich der gemessenen EGFR-mRNA-Expression lag um ein Vielfaches niedriger als bei BMP-7. Aus diesem Grund besaß die densitometrische Auswertung (EGFR-Tumor/Normal-Quotient) eine bessere Aussagekraft, da schon kleine Schwankungen der Menge der in die RT-PCR eingesetzten mRNA das Ergebnis verändern konnte (siehe Tabelle 3.5). Es zeigte sich in 18 Fällen eine erhöhte, in 27 eine leicht erniedrigte EGFR-mRNA-Expression des Tumors versus Normalgewebe. In der anschließenden statistischen Analyse mit klinischen und histopathologischen Parametern ergaben sich keine Bedingtheiten. Immunhistologisch konnte EGFR nur in zwei von 11 Tumoren nachgewiesen werden, wobei das Normalgewebe in allen Fällen negativ blieb. Es

wurden darauf immunhistologisch mit BMP-7- und EGFR-Antikörpern inkubierte Paraffinschnitte, die genau hintereinander lagen, auf die Lage der entsprechenden Immunreaktivität verglichen. Es zeigte sich in einem Tumorgewebeschnittpaar, daß dabei die angefärbten Areale unterschiedlich lokalisiert waren. Welche Bedeutung diese Feststellungen auf mRNA- und Proteinebene haben könnten, konnte nur vermutet werden. Man kann jedoch annehmen, daß eine regulatorische Verbindung zwischen diesen beiden Faktoren möglich ist. In unserer Versuchsanordnung, bei der es sich um die mRNA-Extraktion aller lysierten Zellen einer makroskopisch ausgewählten Tumorprobe handelte, konnte keine weitere Aussage darüber getroffen werden, ob sich diese Unterschiede der BMP-7- und EGFR-Protein-Verteilung auch auf mRNA-Ebene bestätigten. Es war nicht möglich, dabei einzelne Zellverbände zu fokussieren. Zur weiteren Klärung müßte hier die lasergestützte Mikrodisektion aus Gefrier- oder Paraffinschnitten zur Anwendung kommen, mit deren Hilfe aus den oben genannten Arealen einzelne Zellen herausgeschossen werden können, um diese dann gezielt auf ihren mRNA-Gehalt zu untersuchen.

Eine besondere Aufmerksamkeit galt dem BMP-7. Dieses Interesse fußte in seiner Rolle als Wachstums- und Differenzierungsfaktor während der Embryogenese (besonders der Lunge), wobei es vor allem als Kontrolleur induktiver Interaktionen zwischen meso- und ektodermalen Zellen fungiert (Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995). Er stellt einen wichtigen Faktor für die Differenzierung und Aufrechterhaltung epithelialer Zellverbände dar (Simon et al. 1999).

Zunächst wurde untersucht, ob BMP-7 auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR nachzuweisen ist und ob sich dabei Unterschiede im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe aufzeigen.

In allen untersuchten Tumorgewebeproben (46/46) ließ sich eine BMP-7-mRNA-Expression nachweisen. Um einen Vergleich zwischen den Tumor- und Normalgewebeproben durchführen zu können, wurde sich zweier Verfahren bedient. Erstens der qualitativen visuellen Auswertung der gelelektrophoretischen Tumor- bzw. Normalgewebe-BMP-7-Banden, die von zwei unabhängigen Personen vorgenommen wurde. Dabei zeigten 41 Tumorproben eine höhere BMP-7-mRNA-Expression gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe, 4 Probenpaare eine gleich große und bei einem Paar stellte sich die Expression im Normalgewebe als stärker heraus. Als zweites Auswertungsverfahren wurde eine Quotientenbildung herangezogen. Dafür mußten alle Bandenintensitäten densitometrisch ausgemessen werden. Durch die Bildung des BMP-7-Tumor/Aktin-Quotienten unter Einrechnung der densitometrischen Werte der β -Aktin- und der BMP-7-Banden konnte eine

semiquantitative Aussage darüber getroffen werden, wieviel mal höher oder niedriger die BMP-7-mRNA-Expression des Tumors im Vergleich zum Normalgewebe war. Damit war auch eine Möglichkeit zum späteren Vergleich der Tumor- und Normalgewebepaaren untereinander gegeben. Bei 43 von 46 Probenpaaren ließ sich eine höhere Expression in der Tumorgewebeprobe feststellen; ein Paar war gleich, und 2 Paare zeigten eine stärkere Expression in der Normalgewebeprobe. Somit stimmten die Ergebnisse der visuellen und densitometrischen Auswertungen fast überein.

Die RT-PCR stellt ein geeignetes Verfahren dar, den Gehalt an BMP-7- mRNA in Zell- und Gewebeproben zuverlässig und reproduzierbar zu bestimmen. Sie ist relativ schnell, einfach und preiswert. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind so ausgewählt, daß sie in verschiedenen Exonen lokalisiert sind. Daraus resultiert, daß bei einer eventuellen Kontamination mit genomischer DNA wesentlich größere Amplifikate entstehen, die sich eindeutig von der cDNA abgeleiteten PCR-Produkten unterscheiden. Den zur Auswertung herangezogenen Verfahrensweisen lag ein qualitativer (visuell) und ein semiquantitativer Aussagewert (densitometrische Quotientenbildung) zugrunde. Die visuelle Auswertung war zwar einfach und schnell durchzuführen, hatte jedoch den Nachteil, daß sie von der subjektiven Einschätzung der auswertenden Person abhing. Diese Fehlerquelle sollte durch die Auswertung der Ergebnisse von zwei unabhängigen Untersuchern gemindert werden. Da die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Probenpaaren mit diesen rein qualitativen Daten, die ausschließlich eine Aussage darüber trafen, ob in einem Tumor mehr oder weniger BMP-7-mRNA gegenüber dem Normalgewebe gefunden wurde, nicht gegeben war, konnte keine weitergehende statistische Auswertung vorgenommen werden.

Aus diesem Grund wurden die Proben der densitometrischen Vermessung und Quotientenbildung mit β -Aktin-mRNA-Banden unterzogen. β -Aktin kommt als sogenanntes „House-Keeping-Gen“ in fast allen Zellen zu einem relativ vergleichbaren Anteil vor. Es ließ sich so anhand der Stärke der β -Aktin-mRNA-Expression der Probenpaare auf die entsprechende eingesetzte Gesamt-mRNA-Menge schließen, die aus den Tumoren bzw. Normalgewebe extrahiert wurde. Diese Tatsache erhöhte die Genauigkeit unseres Vergleiches gegenüber dem visuellen Verfahren. Als Ergebnis konnte darüber hinaus ein Zahlenwert berechnet werden, der angab, um wieviel sich die Tumor- und Normalgewebeproben voneinander unterschieden. Auf diesen Werten aufbauend war somit eine statistische Analyse möglich.

Trotzdem war der Vergleich mittels Quotient etwas in seiner Genauigkeit gemindert, da keine völlige Sicherheit bestand, daß der β -Aktin-mRNA-Gehalt der Tumorzellen sich nicht im

Laufe der Tumorgenese verändert hatte und so einen leicht zu hohen oder zu niedrigen mRNA-Gehalt der Tumorproben vortäuschte. Da im Zuge der Quotientenbildung nicht durch „Null“ dividiert werden konnte, wurden den Banden, die entweder nicht nachweisbar oder zu schwach für die densitometrische Erfassung waren, die schwächste gemessene Intensität aller Proben der entsprechenden Kategorie zugewiesen. Dies betraf vor allem BMP-7-Banden der Normalgewebeproben, schränkte jedoch den Aussagewert der BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten nicht wesentlich ein, da diese vor allem von der BMP-7-mRNA-Überexpression der Tumorbanden dominiert wurde.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob sich die Veränderungen im Bereich der mRNA auch auf Proteinebene nachweisen ließen. Paraffinschnitte der entsprechenden Tumoren wurden immunhistologisch mit einem hochspezifischen BMP-7-Antikörper inkubiert. In der mikroskopischen Auswertung zeigten bis auf eine Ausnahme – ein Tumor, der fast nur aus nekrotischen Zellen bestand – alle untersuchten Tumore eine deutlich positive Antikörper-Antigen-Bindung, während die Normalgewebeanteile sich durchweg als negativ erwiesen. Damit deckten sich die Ergebnisse sehr gut mit denen unserer Untersuchungen auf mRNA-Ebene. Die immunhistologische Färbung, die sich im Zytoplasma und der Zellmembran zeigte, konzentrierte sich häufig in Bereichen, die vom histologischen Bild einer höheren Differenzierung mit Verhornungstendenzen zugeordnet werden konnte. Um die Stärke der immunhistologischen Färbung abschätzen zu können, wurde ein videogestütztes Auswertungsprogramm (OPTIMAS) eingesetzt, welches den Anteil Immunreaktivität in Prozent pro inkubierte Fläche ausmaß und den sogenannten BMP-7-IR errechnete. Mit diesem Prozentwert konnten die inkubierten Paraffinsschnitte hinsichtlich ihres BMP-7-Proteingehaltes miteinander verglichen werden, und es war wiederum die Möglichkeit zur weiteren statistischen Auswertung gegeben.

Die Methodik der Immunhistologie ist eine hochspezifische, sehr sensitive Möglichkeit, Proteine in Gewebeschnitten nachzuweisen. Sie läßt eine ausgezeichnete qualitative Einordnung zu, und es ist eine Lokalisationsdiagnostik durchführbar. Es war so möglich, genau festzustellen, wo und in welchen Zellstrukturen das BMP-7-Protein vorkam. Die quantitative Auswertung mittels BMP-7-IR besaß den Nachteil, daß sie mit subjektiven Faktoren behaftet war. Bei der computergestützten Auswertung mußten die zu messenden Areale vom Bediener im Mikroskop eingestellt werden. Bei Mehrfachmessungen des BMP-7-IR durch unterschiedliche Personen konnte es zu geringen Abweichungen der Ergebnisse kommen. Ein subjektiver Fehler trat auch bei der densitometrischen Vermessung der mRNA-Ergebnisse auf. Dieser wurde jedoch im Zuge der Quotientenbildung gemindert, da Tumor-

und Normalgewebeprobe, aus denen der Quotient errechnet wurde, immer zusammen dokumentiert und vermessen wurden.

RT-PCR und Immunhistologie unterschieden sich grundlegend darin, daß sie verschiedene Bereiche der Proteinbildung beleuchteten. Die RT-PCR detektierte die mRNA aller Zellen einer makroskopisch ausgewählten Tumor- oder Normalgewebeprobe. Sie bot demnach im hier beschriebenen Verfahren keine Möglichkeit, gezielt nur Tumorzellen für die Untersuchung auszuwählen. Die semiquantitative Auswertung war jedoch relativ genau, da alle Messungen im linearen Bereich mit geringen subjektiven Fehlern durchgeführt wurden. Die immunhistologische Untersuchung war besonders durch einen sehr sensitiven Nachweis der BMP-7-Proteine charakterisiert, welche eine Lokalisationsdiagnostik zuließ. Man muß dabei betonen, daß der Nachweis einer bestimmten mRNA nicht zwangsläufig einen erhöhten Gehalt eines Proteins zur Folge hat. Es handelt sich um die Betrachtung zweier verschiedenen Ebenen im Verlaufe der Proteinproduktion. Es kommt hierbei zu zahlreichen Interaktionen und modulatorischen Einflüssen. Ein vermehrter Nachweis eines Zell-Proteins kann, neben einer erhöhten mRNA-Expression, auch auf eine beschleunigte Aktivierung, einen verminderten Abbau oder auch auf ein vermindertes Ausschleusen aus der Zelle beruhen (Kawabata et al. 1998).

Beide Verfahren, die Detektion der mRNA und des Proteins, kamen jedoch zu einer gemeinsamen Aussage: in allen untersuchten Tumoren konnte eine BMP-7-Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dabei war der Nachweis der mRNA und des Proteins in fast allen Gewebepaaren in den Tumorproben stärker ausgeprägt als in den Normalgeweben, die sich in der Immunhistologie darüber hinaus als durchweg negativ erwiesen.

Die semiquantitativen Ergebnisse flossen daraufhin in die statistische Auswertung ein. Dabei zeigten sich Korrelationen zwischen dem BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten und klinischen Parametern. Umso höher die mRNA-Expression im Tumor im Vergleich mit dem Normalgewebe zu messen war, desto eher galt der Tumor als höher differenziert im histologischen Befund, hatte also einen niedrigeren histologischen Grad. Diese Abhängigkeit besaß höchste Signifikanz zwischen Grad 1 und 3, sowie zwischen Grad 2 und 3 ($p < 0,001$). BMP-7 könnte demnach eine Rolle in der Differenzierung des Tumors haben. Plattenepithelkarzinome, die histologisch als verhornend eingestuft worden waren, wiesen signifikant mehr BMP-7-mRNA-Expression auf als nicht-verhornende Karzinome ($p < 0,044$). Auch bei dem Nodal-Status zeigte sich die Tendenz, daß niedrigere Stadien mit höheren BMP-7-Expressionsleveln einhergingen.

BMP-7-mRNA war – wie oben bereits erwähnt – in allen untersuchten Tumorproben nachweisbar und im Tumor meist höher als im entsprechenden Normalgewebe.

Diese Tatsache fügte sich gut in das Bild der zellulären Regression tumoröser Zellen auf frühere Entwicklungsstadien ein, da BMP-7 eine maßgebliche Rolle in der Differenzierung embryonaler Zellen innehat (Hogan 1996). Besonders wichtig stellt sich BMP-7 dabei in der Entwicklung von Organen wie der Lunge dar, die eine ausgeprägte Ekto- und Mesoderm-Interaktion bei ihrer Ausdifferenzierung durchlaufen (Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995). BMP-7 ist essentiell für die Stimulation, Differenzierung und Unterhaltung eines gesunden epithelialen Zelltypus (Simon et al. 1999). In den vorliegenden Plattenepithelkarzinomen der Lunge schienen hohe BMP-7-Expressionslevel ein Hinweis darauf zu sein, daß die Tumorzellen noch immer bestrebt waren, eine maximale Differenzierung durchzuführen. Sie zeigten ein niedrigeres histologisches Grading, eine vermehrte Verhornung und metastasierten seltener.

Über die Rolle des Faktors BMP-7 in Karzinomen der Lunge wird in der Literatur wenig berichtet. Es wurden noch keine Daten über BMP-7-Expressionsverhalten in Lungenkarzinomen des Menschen im Vergleich zum Normalgewebe veröffentlicht.

Die BMP-7-mRNA-Expression in Tumoren ist in der Literatur schon von einigen Autoren untersucht worden. Die BMP-7-mRNA-Expression wurde in 15 von 35 Proben von invasiv wachsenden duktalem Karzinomen der Mamma mit RT-PCR detektiert (Schwalbe 2000). Dabei waren nur 9 der Normalgewebe positiv. In 20 Fällen war die BMP-7-Expression weder im Tumor noch im Normalanteil nachweisbar. Schwalbe konnte auch in den meisten (5/8) untersuchten Mammakarzinomzelllinien eine BMP-7-mRNA-Expression beobachten. Dabei schwankte die Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Zelllinien erheblich. Weber et al. (1998) wiesen in Osteo- und Chondrosarkomen BMP-7-mRNA mittels RT-PCR nach (im Durchschnitt 44% positiv). Diese Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls humane Osteosarkomzelllinien, in denen im Unterschied zu normalen Osteoblastenzellen die BMP-7-mRNA-Expression in 3 von 3 Fällen nachgewiesen werden konnte. In Prostatakarzinomen ergab sich ebenfalls in 16 von 22 untersuchten Tumorproben ein positives Ergebnis. Dagegen konnte in normalem Prostatagewebe nur in 57% der Proben BMP-7-mRNA gefunden werden. In einem Fall untersuchten Weber et al. (1998) ein Osteosarkom desselben Patienten mit einem niedrigeren und höheren histologischen Grad. Es zeigte sich eine 17-fach höhere BMP-7-mRNA-Expression in der entdifferenzierten Probe, was zunächst einmal im Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht. Weber et al. (1998) beschränkten ihre Untersuchungen jedoch auf

ein Osteosarkompaar des gleichen Patienten ohne Vergleiche mit dem korrespondierenden Normalgewebe. Osteosarkome sind im Gegensatz zu den von uns untersuchten Tumoren mesenchymale Tumoren. BMP-7 erhöht die Proliferation und Differenzierung osseärer Zellen (Knutsen et al. 1993) und wird zur Zeit schon therapeutisch bei schwer heilenden knöchernen Verletzungen eingesetzt. In schnellwachsenden Osteosarkomen könnte der BMP-7-Expressionsgrad höher liegen als in langsamer wachsenden Zellen. Bei epithelialen Zellverbänden jedoch ist BMP-7 essentiell für die Stimulation, Differenzierung und Unterhaltung eines epithelialen Zelltypus (Simon et al. 1999). Man muß daher davon ausgehen, daß das BMP-7-Expressionsverhalten von Osteosarkomen und epithelialen Karzinomen anderen Gesetzmäßigkeiten folgt.

Epitheliale Tumorzellen haben eine hohe Potenz, BMP-mRNA zu exprimieren. Hatakeyama et al. (1997) schlossen dies aus Untersuchungen mittels RT-PCR, die sie an 10 Zelllinien verschiedener Adenokarzinome durchführten. BMP-7-mRNA konnte in Adenokarzinomzellen des Magens (MNK45) und des Rektums nachgewiesen werden. Auch Kusafuka et al. (1998) konnte BMP-7-mRNA mittels RT-PCR in 80% der untersuchten pleomorphen Adenokarzinome nachweisen.

Von allen vier Arbeitsgruppen wurde BMP-7-mRNA mittels RT-PCR in Tumoren nachgewiesen. Auch in Normalgeweben ließ sich eine BMP-7-mRNA-Expression detektieren. Der Anteil der positiven Normalgewebe an allen untersuchten lag jedoch meist unter dem der positiven Tumore.

Weitere Arbeiten, in denen untersucht wurde, wie sich das Verhalten von Tumorzellen unter Zugabe von BMP-7-Protein verändert, geben wichtige Hinweise auf die Wirkungen des BMP-7 auf zellulärer Ebene.

Humane pluripotente embryonale Karzinomzelllinien wurden nach Zugabe von humanem rekombinantem BMP-7 in ihrer Proliferation gehemmt, und gleichzeitig kam es zur Induktion einer Differenzierung (Andrews et al. 1994). Asahina et al. (1996) untersuchten drei pluripotente mesenchymale Zelllinien der Maus. Unter Zugabe rekombinanten BMP-7 kam es zu einer Differenzierung in Adipozyten (bei niedriger Dosierung) und zu Chondro-/Osteoblasten bei höherer Dosierung. Maliakal et al. (1994) demonstrierten, daß BMP-7 in klonalen osteoblastischen Osteosarkomzellen (ROS 17/2.8) der Ratte die Zellproliferation supprimiert und die Expression von osteoblastentypischen Markern stimuliert.

Aus diesen Untersuchungen läßt sich schlußfolgern, daß BMP-7, als Protein zugegeben, eine dosisabhängige proliferationshemmende und differenzierungsfördernde Wirkung auf maligne Zellen hat. Dies würde unser Ergebnisse im bezug auf die BMP-7-mRNA-Expression des

BMP-7 in den verschiedenen differenzierten Tumoren unterstützen, wobei immer zu erwähnen ist, daß es keine Sicherheit dafür gibt, daß ein erhöhter mRNA-Level auch automatisch eine erhöhte Proteinproduktion bedeutet. Es kann jedoch eine Verbindung angenommen werden, da die intrazellulären mRNA-Sequenzen im Normalfall auch translatiert werden.

Higinbotham et al. (1998) konnten mittels In-situ-Hybridisierung und Ribonuclease Protection Assay nachweisen, daß die BMP-7-mRNA-Expression in den meisten chemisch induzierten Nephroblastomen der Ratte niedriger lag als im Normalgewebe. Dieses Fehlen der BMP-7-mRNA-Expression erlaubte den Tumoren, da der Differenzierungsstimulus fehlte, die Akkumulation von entdifferenzierten Blastenpopulationen, die typisch für Nephroblastome sind. Dies könnte ein Hinweis sein, daß unsere gefundene Korrelation zwischen BMP-7-mRNA und des histopathologischen Differenzierungsgrad des Tumors auch für andere Organe gelten könnte. Je höher die BMP-7-Expression ist, desto niedriger der histologische Grad.

In der bisherigen Literatur wird BMP-7 als Faktor beschrieben, der essentiell für die Differenzierung von entarteten Zellen zu sein scheint. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, die BMP-7 auch beim Lungenkarzinom in einer entsprechenden Rolle sehen.

Die Relevanz unserer Ergebnisse liegt darin begründet, daß wir zeigen konnten, daß die BMP-7-mRNA-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Lunge stattfindet und daß sie sich während der Tumorgenese verändert. Dabei ist diese Änderung mit dem histopathologischen Differenzierungsgrad des Tumors signifikant in Verbindung zu bringen.

Eine Schwierigkeit, die jedoch alle Untersuchungen auf mRNA-Ebene betrifft, begründet sich in der Tatsache, daß mit der Detektion der BMP-7-mRNA nicht zwangsläufig auf eine gleichwertige Proteinexpression geschlossen werden kann. Die mRNA-Transkription steht am Anfang eines äußerst komplexen Prozesses. Es folgen Translation, die posttranslationellen Veränderungen (Glykosylierung, Aminosäureaustausche, Abspaltungen), der Transport zur Zellmembran, die Ausschleusung in die Extrazellulärmatrix, die Aktivierung und schließlich der Abbau.

Aus diesem Grund wurden auch die immunhistologischen Ergebnisse einer genauen statistischen Analyse zugeführt. Hinsichtlich des BMP-7-IR zeigten sich jedoch keine Bedingtheiten mit klinischen und histologischen Parametern. Auch eine Korrelation mit den Ergebnissen der RT-PCR (BMP-7-Tumor/Normal-Quotient) konnte nicht hergestellt werden. Damit schien die Aussagefähigkeit des Proteingehaltes eines Tumors hinsichtlich der histopathologischen und klinischen Charakterisierung etwas geringer zu sein als der mRNA-

Gehalt. Viele Faktoren können die Halbwertszeit der Proteine verkürzen oder verlängern (Kawabata et al. 1998). Dazu gehören Veränderungen der Posttranslationsvorgänge, der Oligomerisierung, der Transport in die Extrazellulärmatrix und besonders der Zeitpunkt der dort stattfindenden Abspaltung des C-terminalen Endes, welche die Aktivierung des BMP-Protein bedeutet und dessen Stabilität gegenüber abbauenden Faktoren stark verkürzt (Kawabata et al. 1998). Das Protein findet sich am Ende dieses komplizierten Produktionsvorganges, wobei die mRNA eher am Anfang steht. Zwischen diesen beiden Ebenen kommt es zur Einflußnahme verschiedenster Faktoren, die zur Folge haben, daß sich mitunter Schwankungen der mRNA-Expression nicht in entsprechende Veränderungen auf Proteinebene manifestieren müssen.

Bei der Auswertung der Immunhistologie war jedoch eine Tatsache sehr deutlich geworden: die Verteilung der BMP-7-Proteine in den Tumoren war nicht einheitlich. Es gab Areale mit sehr schwacher und sehr starker Immunreaktivität, wobei die Übergänge fließend verliefen. Besonders die Zonen der Verhornung zählten zu denjenigen Arealen, die meist einen sehr hohen BMP-7-Protein-Gehalt aufwiesen. Dies unterstützt wiederum unsere Annahme, daß BMP-7 als Differenzierungsfaktor wirkt.

In der uns bekannten Literatur fanden sich keine Veröffentlichungen, die eine Charakterisierung von Lungenkarzinomen anhand ihres BMP-7-Protein-Gehaltes vornahmen. Im Rahmen einer weiteren Dissertation wurde die Expression von BMP-7 in Karzinomen der Brust untersucht (Schwalbe 2000). Dabei stellte sich BMP-7 als ein Marker der Differenzierungsaktivität dar. In einem immunhistologisch gefärbten Hautpräparat der Brust stieg der BMP-7-Proteingehalt in Richtung Stratum corneum beständig an, während es im Stratum germinativum nicht nachweisbar war. Darüber hinaus korrelierte der ebenfalls in dieser Studie berechnete BMP-7-IR mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, welcher für eine gute Differenzierung der Tumoren spricht. Diese Feststellungen unterstützten unsere Ergebnisse.

In diesem Zusammenhang soll noch einmal die bereits oben erwähnte lasergestützte Mikrodisektion aus Gefrier- oder Paraffinschnitten genannt werden. Anhand dieser Methode wären zum Beispiel Aussagen möglich, ob Tumorzellen mit einer sehr niedrigen BMP-7-mRNA-Expression eher zur Arealen des Tumors gehören, die der Invasionsfront angehören. Zusammenfassend läßt sich schlußfolgern, daß sich BMP-7 sowohl in der Untersuchung mittels RT-PCR als auch mittels Immunhistologie als Marker der Differenzierungstätigkeit des Tumors bzw. einzelner Tumorzellen zeigte. Dies kann gut mit bisherigen

Veröffentlichung in Einklang gebracht werden, die ebenfalls eine derartige Funktion des BMP-7 in ihren Untersuchungen feststellen konnten.

Wir konnten zeigen, daß BMP-Proteine, hier im besonderen das BMP-7, einen Anteil an der molekularen und histopathologisch-klinischen Charakterisierung eines Tumores haben. Im weiteren müßten vor allem Studien folgen, in denen die Wirkung des BMP-7-Proteins auf Tumorzellen examiniert wird. Auch die Veränderungen und Einflüsse auf die intrazelluläre BMP-Signalkaskade (z.B. SMAD-Proteine), auf die Expression und Präsentation der Rezeptoren für BMP-7 an der Zelloberfläche und die Wirkungen auf die DNA-Transkription, bedürfen einer weiteren Klärung. Als sehr interessant dürften auch Nachforschungen auf dem Gebiet der extra- und intrazellulären Interaktionen zwischen den einzelnen Faktoren (zum Beispiel BMP- und ErbB-Familie) sein.

Das Ziel unserer Untersuchungen ist das bessere Verständnis molekularer Signalsysteme und seiner Steuerungskomponenten. Daran können sich neue diagnostische und therapeutische Entwicklungen anschließen. Im Hinblick auf den hier besonders genau untersuchten Faktor BMP-7 könnte dies bedeuten, daß sich anhand der BMP-7-mRNA-Expression einer Tumorprobe Aussagen machen lassen, die zur effizienteren individuellen Charakterisierung des Tumors beitragen. So kann die Prognose besser abgeschätzt und die Therapie bestmöglichst nach den Eigenschaften der Tumorzellen ausgewählt werden. Auch neue Therapieansätze sind möglich: es könnte versucht werden, zum Beispiel durch kontrollierte iatrogene Zufuhr von BMP-7-Protein den Tumor so zu beeinflussen, daß er im Wachstum und in seiner Aggressivität gehemmt wird und so einer Therapie besser zugänglich ist.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 46 Plattenepithelkarzinome der Lunge (NSCLC) und die entsprechenden Normalgewebeproben auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Immunhistologie untersucht.

Es wurde sich dabei auf Faktoren der TGF β -Familie konzentriert. In allen untersuchten Tumorproben konnte BMP-7-mRNA nachgewiesen werden, wobei sich die mRNA-Expression in den meisten Fällen stärker zeigte als die des korrespondierenden Normalgewebes. Die mRNA-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebeproben wurden semiquantitativ eingeordnet. Es zeigten sich eine signifikante Korrelationen mit histopathologischen und klinischen Parametern: Je höher die mRNA-Expression im Tumor im Vergleich mit dem Normalgewebe zu messen war, desto eher galt der Tumor als höher differenziert im histologischen Befund, hatte also einen niedrigeren histologischen Grad. Plattenepithelkarzinome, die histologisch als verhornend eingestuft worden waren, wiesen signifikant mehr BMP-7-mRNA-Expression auf als nicht-verhornende Karzinome. Auch bei dem pN-Status zeigte sich die Tendenz, daß niedrigere Stadien mit höheren BMP-7-mRNA-Expressionsleveln einhergingen.

Immunhistologisch konnte ein ähnliches Bild festgestellt werden. In alle untersuchten Paraffinschnitten konnten in den tumorösen Anteilen BMP-7-Proteine nachgewiesen werden, wobei sich die Normalgewebe als durchweg negativ erwiesen. Im Zuge der statistischen Analyse anhand des BMP-7-IR ließen sich jedoch keine Korrelationen mit histopathologischen Parametern und den RT-PCR-Ergebnissen nachweisen.

Beide Untersuchungen zeigten, daß BMP-7 sowohl als mRNA als auch als Protein in Plattenepithelkarzinomen der Lunge nachzuweisen ist. Beim Vergleich mit dem korrespondierenden Normalgewebeproben konnte dabei bei beiden Verfahren höhere Werte bei den Tumorproben festgestellt werden. Die Untersuchung mittels RT-PCR eröffnete zudem die Möglichkeit, anhand der BMP-7-mRNA-Überexpression des Tumors gegenüber dem Normalgewebe auf die histopathologischen Eigenschaften der untersuchten Lungenneoplasie zu schließen. BMP-7 besitzt nach unseren Ergebnissen auch in Plattenepithelkarzinomen der Lunge eine differenzierende und damit proliferationshemmende Wirkung.

Anhang

Nr.	β -Aktin Tumorprobe	β -Aktin Normalgewebeprobe	Quotient Aktin Tumor/Normal
1	5812	3009	1,93
2	96521	84092	1,15
3	71873	75465	0,95
4	106419	33880	3,14
5	72886	61766	1,18
6	78520	44998	1,74
7	72988	67558	1,08
8	87004	53096	1,64
9	91534	67175	1,36
10	11596	8452	1,37
11	65373	59347	1,10
12	66840	16732	3,99
13	50000	55000	0,91
14	61055	38140	1,60
15	25964	12890	2,01
16	23785	6950	3,42
17	33572	7118	4,72
18	27620	18964	1,46
19	19287	61139	0,32
20	72232	25120	2,88
21	56976	69559	0,82
22	61267	23041	2,66
23	42863	32158	1,33
24	41005	43389	0,95
25	45389	13655	3,32
26	8954	46558	0,19
27	52043	4102	12,69
28	17627	9920	1,78
29	45118	44127	1,02
30	49992	36523	1,37
31	12700	9481	1,34
32	21506	2132	10,09
33	4372	3252	1,34
34	5318	2132	2,49
35	21141	4487	4,71
36	20277	4322	4,69
37	19194	3740	5,13
38	15930	8192	1,94
39	31971	28278	1,13
40	11512	8190	1,41
41	29205	11679	2,50
42	27347	16038	1,71
43	35278	30367	1,16
44	30037	2132	14,09
45	28669	19218	1,49
46	32833	7698	4,27

Tabelle A1: Quotientenbildung der densitometrisch gemessenen β -Aktin-Werte für Tumor- und Normalgewebeprobe

Nr.	BMP-7	BMP-7	Quotient
	Tumorprobe	Normalgewebeprobe	BMP-7 Tumor/Normal
1	13064	1672	7,81
2	89012	3846	23,14
3	43822	42579	1,03
4	92364	1672	55,24
5	3808	1672	2,28
6	9702	1672	5,80
7	2063	1672	1,23
8	88245	1672	52,78
9	51579	13337	3,87
10	5845	1672	3,50
11	76567	1672	45,79
12	157376	1672	94,12
13	37664	1672	22,53
14	152771	44822	3,41
15	59955	1672	35,86
16	14603	14939	0,98
17	51625	1672	30,88
18	39334	1672	23,53
19	76196	6553	11,63
20	42982	5345	8,04
21	70077	1672	41,91
22	86283	1672	51,60
23	15173	1672	9,07
24	9690	1672	5,80
25	39840	1672	23,83
26	4167	8311	0,50
27	35123	1672	21,01
28	10102	1672	6,04
29	44462	1672	26,59
30	26892	1672	16,08
31	45591	7751	5,88
32	44517	1672	26,63
33	37707	1672	22,55
34	2063	1672	1,23
35	8054	1672	4,82
36	54691	11790	4,64
37	35189	1672	21,05
38	51740	12840	4,03
39	4167	1672	2,49
40	4643	1672	2,78
41	27384	1672	16,38
42	18309	1672	10,95
43	28677	4073	7,04
44	25918	1672	15,50
45	14685	1672	8,78
46	29613	1672	17,71

Tabelle A2: Quotientenbildung der densitometrisch gemessenen BMP-7-Werte für Tumor- und Normalgewebeproben

Nr.	BMP-7	β -Aktin	BMP-7
	Tumor / Normal	Tumor / Normal	Tumor/Normal-Quotient
1	7,81	1,93	4,05
2	23,14	1,15	20,16
3	1,03	0,95	1,08
4	55,24	3,14	17,59
5	2,28	1,18	1,93
6	5,80	1,74	3,33
7	1,23	1,08	1,14
8	52,78	1,64	32,21
9	3,87	1,36	2,84
10	3,50	1,37	2,55
11	45,79	1,10	41,57
12	94,12	3,99	23,56
13	22,53	0,91	24,78
14	3,41	1,60	2,13
15	35,86	2,01	17,80
16	0,98	3,42	0,29
17	30,88	4,72	6,55
18	23,53	1,46	16,15
19	11,63	0,32	36,86
20	8,04	2,88	2,80
21	41,91	0,82	51,17
22	51,60	2,66	19,41
23	9,07	1,33	6,81
24	5,80	0,95	6,13
25	23,83	3,32	7,17
26	0,50	0,19	2,61
27	21,01	12,69	1,66
28	6,04	1,78	3,40
29	26,59	1,02	26,01
30	16,08	1,37	11,75
31	5,88	1,34	4,39
32	26,63	10,09	2,64
33	22,55	1,34	16,77
34	1,23	2,49	0,49
35	4,82	4,71	1,02
36	4,64	4,69	0,99
37	21,05	5,13	4,10
38	4,03	1,94	2,07
39	2,49	1,13	2,20
40	2,78	1,41	1,98
41	16,38	2,50	6,55
42	10,95	1,71	6,42
43	7,04	1,16	6,06
44	15,50	14,09	1,10
45	8,78	1,49	5,89
46	17,71	4,27	4,15

Tabelle A3: Berechnung des BMP-7-Tumor/Normal-Quotienten. Dabei wurden die Quotienten der BMP-7-Werte (siehe A2) der Tumor-/Normalgewebeprobe durch die Quotienten der β -Aktinwerte (siehe A1) der entsprechenden Tumor- und Normalgewebeprobe dividiert.

Nr.	EGFR	EGFR	Quotient
	Tumorprobe	Normalgewebeprobe	EGFR Tumor/Normal
1	14318	34287	0,42
2	77981	70442	1,11
3	64466	70446	0,92
4	48122	21854	2,20
5	43569	41845	1,04
6	23410	13702	1,71
7	6700	27604	0,24
8	100740	18123	5,56
9	123122	96946	1,27
10	26774	31331	0,85
11	108500	103294	1,05
12	97160	71310	1,36
13	80629	26844	3,00
14	98754	92073	1,07
15	33691	23810	1,41
16	31029	25859	1,20
17	27450	19181	1,43
18	30506	25168	1,21
19	22375	22874	0,98
20	26952	24724	1,09
21	16478	4757	3,46
22	18357	4660	3,94
23	37915	23597	1,61
24	34051	37301	0,91
25	39840	1600	24,90
26	7837	38733	0,20
27	44497	36576	1,22
28	32630	7868	4,15
29	43146	15506	2,78
30	44322	21542	2,06
31	19796	9592	2,06
32	8929	7194	1,24
33	15860	951	16,68
34			
35	11113	4744	2,34
36	20180	5388	3,75
37	19131	14740	1,30
38	15610	4056	3,85
39	31087	10528	2,95
40	5738	9200	0,62
41	30048	11658	2,58
42	16151	7538	2,14
43	27946	17649	1,58
44	4999	4379	1,14
45	13669	14795	0,92
46	29267	12002	2,44

Tabelle A4: Quotientenbildung der densitometrisch gemessenen EGFR-Werte für Tumor- und Normalgewebeprobe

Nr.	EGFR	Aktin	EGFR
	Tumor / Normal	Tumor / Normal	Tumor/Normal-Quotient
1	0,42	1,93	0,22
2	1,11	1,15	0,96
3	0,92	0,95	0,96
4	2,20	3,14	0,70
5	1,04	1,18	0,88
6	1,71	1,74	0,98
7	0,24	1,08	0,22
8	5,56	1,64	3,39
9	1,27	1,36	0,93
10	0,85	1,37	0,62
11	1,05	1,10	0,95
12	1,36	3,99	0,34
13	3,00	0,91	3,30
14	1,07	1,60	0,67
15	1,41	2,01	0,70
16	1,20	3,42	0,35
17	1,43	4,72	0,30
18	1,21	1,46	0,83
19	0,98	0,32	3,10
20	1,09	2,88	0,38
21	3,46	0,82	4,23
22	3,94	2,66	1,48
23	1,61	1,33	1,21
24	0,91	0,95	0,97
25	24,90	3,32	7,49
26	0,20	0,19	1,05
27	1,22	12,69	0,10
28	4,15	1,78	2,33
29	2,78	1,02	2,72
30	2,06	1,37	1,50
31	2,06	1,34	1,54
32	1,24	10,09	0,12
33	16,68	1,34	12,40
34			
35	2,34	4,71	0,50
36	3,75	4,69	0,80
37	1,30	5,13	0,25
38	3,85	1,94	1,98
39	2,95	1,13	2,61
40	0,62	1,41	0,44
41	2,58	2,50	1,03
42	2,14	1,71	1,26
43	1,58	1,16	1,36
44	1,14	14,09	0,08
45	0,92	1,49	0,62
46	2,44	4,27	0,57

Tabelle A5: Berechnung des EGFR-Tumor/Normal-Quotienten. Dabei wurden die Quotienten der EGFR-Werte (siehe A4) der Tumor-/Normalgewebeprobe durch die Quotienten der β -Aktinwerte (siehe A1) der entsprechenden Tumor- und Normalgewebeprobe dividiert.

Literaturverzeichnis

Andrews PW, Damjanov I, Berends J, Kumpf S, Zappavigna V, Mavilio F, Sampath K. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of pluripotent human embryonal carcinoma cells by osteogenic protein-1 (or bone morphogenetic protein-7). *Lab Invest.* 1994 Aug;71(2):243-51

Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S, Fujisawa Y. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 May 25; 210(3):670-7

Arnold SF, Tims E, Mcgrath BE. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2. *Cytokine.* 1999 Dec;11(12):1031-7.

Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV, Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 1996, 222: 38-47

Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J Cell Biol* 1993, 123: 921-933

Becher H (1992) Epidemiologie des Bronchialkarzinoms. *Münch Med Wochenschr* 134:569-574

Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BLM. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein-4 (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* 1996, 122:1693-1702.

Bennett WP, Colby TV, Travis A et al. (1993) p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 53:4817-4822

Bentley H, Hamdy FC, Hart KA, Seid JM, Williams JL, Johnstone D, Russell RG. Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer*. 1992 Dec;66(6):1159-63.

Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 1995, 172: 126-138.

Blessing M, Nanney LB, King LE, Jones CM, Hogan BLM. Transgenic mice as a model to study the role of Tgf- β -related molecules in hair follicles. *Genes & Dev.* 1993, 7:204-215.

Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(24):9843-7.

Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000 May;126(5):271-9

Clement JH, Sanger J, Hoffken K. Expression of bone morphogenetic protein 6 in normal mammary tissue and breast cancer cell lines and its regulation by epidermal growth factor. *Int J Cancer*. 1999 Jan 18;80(2):250-6.

Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11740-4

Davidson D. The function and evolution of Msx genes: Pointers and paradoxes. *Trends Genet.* 1995, 11:405-411

De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (1993) *Cancer, Principles and practice of oncology*. Lippincott, Philadelphia. pp 673-723

Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev.* 1995 Oct;16(5):559-89.

Doll R, Hill AB (1950) Smoking and carcinoma of the lung. Preliminary report. Br Med J II:739-748

Drozdoff V, Wall NA, Pledger WJ, Expression and growth inhibitory effect of decapentaplegic Vg-related protein 6: evidence for a regulatory role in keratinocyte differentiation. Proc nat Acad Sci 1994, 91, 5528-5532

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes Dev. 1995 Nov 15;9(22):2795-807

Enterline PE, Henderson VL, Marsh GM (1987) Exposure to arsenic and respiratory cancer. A reanalysis. Am J Epidemiol 125:929-938

Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. Mech Dev 1997, 63, 39-50

Fontham ETH, Correa P, Wu-Williams A et al. Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women: a multicenter study. J Am Med Assoc 1994, 271: 1752-1759

Gazdar AF (1990) Molecular markers for the diagnosis and prognosis of lung cancer. Cancer [Suppl] 69:1592-1599

Ghosh Choudhury G, Jin DC, Kim YSs, Celeste A, Ghosh-Choudhury N, Abboud HE. Clonal osteoblastic cell lines from p53 null mouse calvariae are immortalized and dependent on bone morphogenetic protein 2 for mature osteoblastic phenotype. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Feb 3;231(1):196-202.

Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang CS, Rosen V. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. J Cell Biochem 1995, 58, 393-402

Harada S-I, Sampath TK, Aubin JE, Rodan GA. Osteogenic protein-1 upregulation of the collagen X promoter activity is mediated by a MEF-2 like sequence and requires an adjacent AP-1 sequence. *Mol Endocrinol* 1997, 11, 1832-1845.

Harris SE, Feng JQ, Harris MA, Gosh-Choudhury N, Dallas MR, Wozney J, Mundy GR. Recombinant bone morphogenetic protein 2 accelerates bone cell differentiation and stimulates Bmp-2 mRNA expression and Bmp-2 promoter activity in primary fetal rat calvarial osteoblast cultures. *Mol Cell Differ* 1995, 3: 137-155.

Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massagué J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 1997, 388, 82-87.

Hatakeyama S, Gao YH, Ohara-Nemoto Y, Kataoka H, Satoh M, Expression of bone morphogenetic proteins of human neoplastic epithelial cells. *Biochem Mol Biol Int* 1997, 42: 497-505

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF-beta receptor and functions as an antagonist of TGF-beta signaling. *Cell* 1997, 89, 1165-1173.

Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 1994, 77: 283-295

Higinbotham KG, Karavanova ID, Diwan BA, Perantoni AO, Deficient expression of mRNA for the putative inductive factor bone morphogenetic protein-7 in chemically initiated rat nephroblastomas. *Mol Carcinog* 1998, 23: 53-61

Hoar-Zahm S, Browson RC, Chang JC, Davis JR (1989) Study of lung cancer histologic types, occupation, and smoking in Missouri. *Am J Industr Med* 15:565-578

Hogan BLM, Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996, 10, 1580-1594.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancer, Science 253:49-53

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1987), Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs, vol I to 42, Supplement 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 335:675-679

Imamura T, Takase M, Nishihara A, Hanai J-i, Oeda E, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. Nature 1997, 389, 622-626.

Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. Growth Factors 1996, 13, 291-300

Jöckel KH, Ahrens W, Jahn I, Pohlabeln H, Bolm-Audorff U (1995) Untersuchungen zu Lungenkrebs und Risiken am Arbeitsplatz. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsmedizin, Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven (in press)

Jones CM, Lyons KM, Hogan BLM. Involvement of Bone Morphogenetic protein-4 (Bmp-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. Development 1991, 111:531-542.

Kalemkerian GP: Biology of lung cancer. Curr Op Oncol 6:147-155

Katoh M, Terada M. Overexpression of bone morphogenic protein (BMP)-4 mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type. J Gastroenterol. 1996 Feb;31(1):137-9

Kawabata M, Chytil A, Moses HL. Cloning of a novel type II serine threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor. J Biol Chem 1995, 270, 5625-5630

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Signal Transduction by Bone Morphogenetic Proteins. Cytokine and Growth Fact Rev 1998, 9: 49-61

Keeton MR, Curriden SA, van Zonneveld AJ, Loskutoff DJ. Identification of regulatory sequences in the type I plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor-beta. J Biol Chem 1991, 266, 23048-23052.

Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene ML, Torney L, Robinson RA (1988) p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. Cancer Res 50: 5184-5191

Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. Science, 1996 Jan 19;271(5247):360-2.

King J, Marker PC, Seung KS, Kingsley DM. Bmp5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. Dev. Biol. 1994, 166: 112-122.

Kingsley DM, The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms, Genes Dev 1994, 8, 133-146.

Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M. Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. Gastroenterology. 1999 May;116(5):1202

Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S, Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1993, 194: 1352-8

Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S. Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1993 Aug 16;194(3):1352-8.

Kretzschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*. 1997 Oct 9;389(6651):618-22

Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massagué J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997, 11, 984-995.

Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Fujiwara M, Takemura T. Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas. *Virchows Arch* 1998, 432:247-253

Küsswetter W, Teschner M. Gentechnisch induziertes Knochenwachstum. *Dt Arztebl* 1999; 96: A-1891-1896 [Heft 28-29]

Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, Stachel SE, Economides AN, Stahl N, Yancopoulos GD, Harland RM. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 1993, 262, 713-718

Lubin JH. Blot WJ (1984) Assessment of lung cancer risk factors by histologic category. *JNCI* 73:383-389

Luo G, Hofmann C, Bronckers ALJJ, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995 Nov 15;9(22):2808-20

Maliakal JC, Asahina I, Hauschka PV, Sampath TK, Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblast phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. *Growth Factors* 1994, 11: 227-34

Mishina Y, Susuki A, Ueno N, Behringer RR. BMPr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, 1995, 9, 3027-3037.

Mountain F (1986) A new international staging-system for lung cancer. *Chest [Suppl]* 98:225-232

Müller KM, Junker K, Wiethage T. Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom. *Onkologe* 1995, 1: 429-440

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin N-E, Heldin C-H, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF-beta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 1997, 389, 631-635.

Nakao A, Imamura T, SoucheInytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J-i, Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997, 16, 5353-5362.

Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K et al. (1995) Mutations in the p16 (INK4)/MTS1/CDKN2, p15(INK4B)/MZS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res* 55:1448-1451

Padgett RW, Wozney JM, Gelbart WM. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci* 1993, 90:2905-9.

Pershagen G. Simonato L (1990) Epidemiological evidence on air pollution and cancer. In: Tomatis L (Ed.) *Air Pollution and Human Cancer*. Springer. Berlin Heidelberg New York

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM, Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996, 86, 589-598

Pronk GJ, Bös JL (1994) The role of p21RAS in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim Biophys Acta* 1198:131-147

Raida M, Sarbia M, Clement JH, Adam S, Gabbert HE, Hoffken K. Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999 Sep 24;83(1):38-44.

Reddi AH, Bone Morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. Cytokine Growth Factor Rev 1997, 8, 11-20

Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. Development. 1995 Oct;121(10):3163-74.

Roth JA, Cox JD, Hong WK (1993) Lung cancer. Blackwell Scientific Publications, Cambridge Massachusetts, pp 57-104

Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Couchlin JE, Ticker MM, Pang RHL, Corbett C, Ozhaynak E, Oppermann H, Rueger DC. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOp-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with neural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 1992, 267, 20352-20362

Sampath TK, Rashka KE, Doctor JS, Tucker RF, Hoffmann FM. Drosophila transforming growth factor superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90, 2905-2909.

Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, De Robertis EM. Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in Xenopus. Nature 1995, 376: 333-337

Schmidt JE, Suzuki A, Ueno N, Kimelman D. Localized BMP-4 mediates dorsal/ventral patterning in the early Xenopus embryo. Dev Biol. 1995 May;169(1):37-50.

Schwalbe Manuela 2000, Dissertationsschrift, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Shi V, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4, Nature 1997, 388, 87-93.

Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7282-7

Slamon TJ, Rodenhuis S (1992) The ras y. gene family in human non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 13:23-29

Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 2):F382-9

Stanley E, Biben C, Kotecha S, Fabri L, Tajbakhsh S, Wang CC, Hatzistavrou T, Roberts B, Drinkwater C, Lah M, Buckingham M, Hilton D, Nash A, Mohun T, Harvey RP. DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* cerberus. *Mech Dev*. 1998 Oct;77(2):173-84.

Steindorf K, Luhn J, Wichmann H-E, Becher H (1995) Lung cancer deaths attributable to indoor radon exposure in west germany. *Int J Epidemiol* 24:485-492

Steinmetz KA, Potter JD (1991) Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 2:325-357

Stockwell HG, Goldman AL, Noss CI, Armstrong AW, Pinkham PA, Candelora EC, Brusa MR. Environmental tobacco smoke and lung cancer risk in non-smoking women. *J Natl Cancer Inst* 1992, 84: 1417-1422

Tada A, Nishihara T, Kato H. Bone morphogenetic protein 2 suppresses the transformed phenotype and restores actin microfilaments of human lung carcinoma A549 cells. *Oncol Rep*. 1998 Sep-Oct;5(5):1137-40

ten Dijke P, Miyazono K, Heldin C-H. Signaling via hetero-oligomeric complex of type I and type II serine threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1996, 8, 139-145.

Testa J, Siegfried JM (1992) Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 52:2702-2706

Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-Mesenchymal signaling during tooth development. *Connective Tissue Res* 1995, 32, 9-15

Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 1992, 130: 1318-1324

UICC (1993) TNM, Klassifikation maligner Tumoren, 4. Aufl., 2. Revision. Springer, Berlin Heidelberg New York

Urist MR, Bone: formation by autoinduction, *Science* 1965, 150, 893-899.

Vaahtokari A, Abert T, Jernvall J, Keranen S, Theslen I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* 1996b, 54: 39-43

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of Bmp-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993, 75: 45-58.

Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1989, 86:8793-8797

Weber KL, Bolander ME, Sarkar G, Selective differential fingerprinting. A method for identifying differentially expressed genes in a family between two samples. *Mol Biotechnol* 1998, 10: 77-81

Wiethage T, Voss B, Müller K-M (1994) Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene bei der Pathogenese von Lungentumoren, *Pathologie* 15:321-330

Wiethage T, Voss B, Müller KM (1995) p53 accumulation and PCNA expression in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 121:371-377

Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 1999 Mar-Apr;36(2):120-5.

Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 1995, 376, 331-333

Wilson PA, Lagna G, Suzuki A, Hemmati-Brivanlou A, Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development* 1997, 124, 3177-3184.

Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BLM. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995, 9, 2105-2116.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA, Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988, 242, 1528-1534

Yamada N, Kato M, ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Heldin CH, Miyazono K, Funa K. Bone morphogenetic protein type IB receptor is progressively expressed in malignant glioma tumours. *Br J Cancer.* 1996 Mar;73(5):624-9.

Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney IM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 1991, 113: 681-687.

Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin C-H, Miyazono K. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects, *J Cell Biol* 1995, 130, 217-226

Zhao M, Takata T, Ogawa I, Takekoshi T, Nikai H. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and type II collagen in pleomorphic adenoma of salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 1998 Aug;27(7):293-6

Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Speman organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996, 86, 599-606

Veröffentlichungen

Menck, N., Sänger, J., Clement, J.H., Schwalbe, M., Schneider, C.-P., Schmidt, A. und Höffken, K. 2000. Expression des Knochenmorphogenesefaktors 7 (BMP-7) in Plattenepithel-Karzinomen der Lunge. 106. Jahrestagung der DGIM, 29.04. – 03.05.2000, Wiesbaden

Clement, J.H., Menck, N., Sänger, J., Schwalbe, M., Schneider, C.-P., Schmidt, A. und Höffken, K. 2000. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) is differentially expressed in squamous cell carcinomas of the lung. International Conference Bone Morphogenetic Proteins 2000, 7.-11. Juni 2000, Granlibakken, USA

Raida, M., Clement, J.H., Sanger, J., Schwalbe, M., Adam, S., Menck, N., Höffken, K. 2000. Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and 7 (BMP-7): Markers of tumour cell differentiation and progression. Symposium on the impact of biotechnology on cancer diagnostic and prognostic indicators, Genf, 28.-31.10.2000

Menck, N., Sänger, J., Clement, J.H., Schmidt, A. und Höffken, K. 2000. Expression von Knochenmorphogenesefaktoren (BMP) in Plattenepithelkarzinomen der Lunge – neue Ergebnisse. XV. Pulmologisch-Onkologisches Colloquium, 06.-08.10.2000, Zentralklinikum Bad Berka.

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich folgenden Personen danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützten:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus Höffken, der mir dieses Thema überließ und mich stets unterstützte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement, der mich während der gesamten Promotionszeit in jeder Hinsicht hervorragend betreute.

Dr. rer. nat. Manuela Schwalbe, Dana Hüttig, Anja Waldau, Conny Jörke und allen Mitarbeitern des Onkologischen Labors der KIM Jena, die mir besonders während meiner Labortätigkeit immer hilfreich zur Seite standen.

Dr. med. habil. Andreas Schmidt und Dr. rer. nat. Jörg Sängler, sowie dem gesamten Team des Institutes für Pathologie Bad Berka für die sehr gute Zusammenarbeit und Betreuung.

Dr. med. Claus-Peter Schneider für die klinische Beratung.

Meiner Freundin Anja Noltemeyer und meinen langjährigen Mitbewohnern Christian Bölzner und Lars Zeggel, die mir während mancher Durststrecke immer wieder beistanden.

Allen anderen Freunden und Bekannten, die ich hier nicht erwähnt habe und die mir auf dem Weg zur Fertigstellung der Arbeit geholfen haben.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mir während des ganzen Studiums immer einen Ort bot, an dem ich etwas Abstand und neue Energie gewinnen konnte und die mir dieses Studium erst ermöglichte.

Jena, den 22. Mai 2002

Niels Menck

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. K. Höffken, Dr. rer. biol. hum. J. Clement,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für meine Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 22. Mai 2002

Niels Menck

LEBENS LAUF

Name: Niels Menck
Anschrift: Carmerstraße 47
99085 Erfurt
Geburtsdatum/-ort: 30. November 1974 in Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1981 – 85 Grundschole Schömborg (Kreis Calw)
1985 - 94 Gymnasium Neuenbürg / Baden-Württemberg
1994 Abschluß mit dem Abitur

Wehrdienst

1994-95 131. Sanitätsbataillon in Halle an der Saale und Philippsburg

Studium

1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2001 - 02 Praktisches Jahr

Jena, den 22. Mai 2002

Niels Menck